

50376
1993
185

50376
1993
185

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

SCIENCES DE LA VIE ET DE SANTE

N° d'ordre 1148

MEMOIRE DE THESE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE
DOCTEUR D'UNIVERSITE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

REDIGE ET PRESENTE PAR

Paul BECQUART

Titre:

ETUDE
DE LA PERMISSIVITE DES CELLULES
TRANSFORMEES AUX PARVOVIRUS
AUTONOMES

Date : Jeudi 8 Juillet 1993



Jury de Soutenance :

Professeur A. VERBERT (Président)

Professeur J. ROMMELAERE (Directeur de Thèse)

Professeur F. MORINET (Rapporteur)

Professeur J. SCHLEHOFER (Rapporteur)

SCD LILLE 1



D 030 288856 9

50376
1993
185

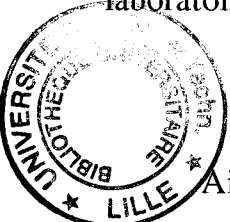
2

50376
1993
185

REMERCIEMENTS


TOURNÉE

Ce mémoire de thèse est l'achèvement d'un long cursus universitaire débuté en 1980. Cette entreprise ne pouvait pas aboutir sans le soutien, le concours et l'amitié manifestés par ma famille, mes amis et la faune étrange et passionnante du laboratoire d'oncologie moléculaire de l'institut Pasteur de Lille.



Ainsi cette thèse est dédiée en tout premier lieu à ma femme Blandine et mes enfants qui ont supporté avec compréhension, enthousiasme et intérêt cette longue quête, ces soirées à la paillasse, ces victoires et désillusions. Ils ont cru en moi, je saisis ici l'opportunité de leur témoigner ma reconnaissance.

Mes parents m'ont toujours soutenu, aidé et espéré cette conclusion. Je reconnais ici leur abnégation manifestée à mon égard, grâce à eux, je suis fier et heureux de faire de la recherche scientifique.



Je remercie le Professeur Dominique Stehelin de m'avoir accueilli dans son laboratoire d'oncologie moléculaire, grâce à sa notoriété et aux gens de valeur qui peuplent cette grande famille, j'ai acquis un niveau scientifique reconnu qui m'a valu de démarrer une carrière de chercheur au faîte des biotechnologies.

Le professeur Jean Rommelaere a accepté de m'intégrer dans son équipe de parvovirologistes, une fois. J'ai pu apprécier durant ces 4 années de thèse, sa sympathie et la confiance qu'il a placée en mon travail. Au sein de cette équipe, j'ai évolué dans l'expérience et la camaraderie. Je vous remercie tous de m'avoir supporté, formé, écouté.

Ce travail ne s'est pas accompli en autarcie chez les "parvo". C'est pourquoi je tiens à remercier tout particulièrement Agnès Bègue et Christian Lagrou (Papy) pour leur inégalable expérience, la sympathie et l'aide précieuse qu'ils ont tous deux manifestées.

Une mention spéciale à Thierry Dupressoir qui m'a apporté l'appui et les conseils nécessaires à la conclusion de cette thèse.

J'apprécie encore au sein de ma mémoire ces pauses-café, ces soirées interminables et ces week-end intemporels au laboratoire où Science, Philosophie et Humour se côtoyaient. Comment pourrais-je oublier ces moments enrichissants passés avec Jean Coll, Patrick Martin, Jean-Marc Vanacker, Vincent Laudet, Nathalie Salomé, etc, etc.

Je ne peux pas tous vous nommer ni pourquoi, il me faudrait écrire un autre mémoire, mais soyez assurés que je fus TRES HEUREUX d'être parmi vous, c'est pourquoi mon départ dans l'industrie, bien que volontaire, fût une déchirure dont il est encore vain de guérir.

ABREVIATIONS

AAV	Virus adéno-associés	µl	micro litre
ADN = DNA	Acide désoxyribonucléique	M	Molaire
ARN	Acide ribonucléique	mA	milli ampère
ARNm	ARN messenger	MEM	Modified Eagle's medium
°C	degré Celsius	ml	millilitre
CAT	Chloramphénicol acétyltransférase	mM	milli Molaire
cDNA	DN complémentaire	mm	milli mètre
cf	confère	MMTV	Mouse mammary tumor virus
cfu	unité formant une colonie	mn	minute
cm	centimètre	M.O.I.	Multiplicité d'infection (particule/cellule)
CoA	co-enzyme A	M-MuLV	Moloney murine leukemia virus
coll	collaborateur	MVM	Minute virus of mice
cpm	coups par minute	N	Normale
d	densité	nm	nanomètre
DEPC	Diéthyl pyrocarbonate	NS	non-structurale
DMSO	Diméthyl sulfoxyde	nt	nucléotide
DNase	Désoxyribonucléase	OH	Hydroxyl
EDTA	Acide éthylènedinitrotétraacétique	ORF	Open reading frame (cadre de lecture)
Fig	Figure	PBS ⁻	Tampon phosphate
g	9.81 Newton	PEG	poly éthylène glycol
G418	Geneticine = neomycine	pfu	particules virales infectieuses
H-1	Hamster osteolytic virus	pH	potentiel Hydrogéné
HAU	unité d'hémagglutination	poly A+ (-)	(non) polyadénylé
IgM	Immunoglobuline de classe M	RNase	Ribonucléase
kb	kilo-bases (1 000 bases)	SDS	Sodium dodecyl sulfate
kbp	kilo paires de bases	SV40	Simian virus 40
kD	kilo-Daltons	SVF	Sérum de veau foetal
KRV	Khillam rat virus	ts	thermosensible
LTR	Longue répétition terminale	V	Volts
µCi	micro Curie	vol	volume
µg	micro gramme		

RESUME

Les parvovirus autonomes interfèrent in vitro avec les processus de transformation cellulaire maligne causés par le virus SV40. In vivo ces virus interfèrent également avec les processus de tumorigénèse induite ou non par des agents viraux et chimiques. Dans notre laboratoire il fut montré qu'ils inhibaient également l'implantation de cellules tumorales et la croissance de tumeurs pré-établies parfois jusqu'à complète rémission.

Nous démontrons ici que l'acquisition de la permissivité des cellules humaines aux parvovirus de rongeurs peut être obtenue à partir d'autres genres d'agents transformants (physiques et chimiques). Cette augmentation de la sensibilité est à mettre en corrélation avec une capacité accrue à amplifier l'ADN parvoviral mais non avec une production virale efficace.

Bien que la transformation maligne soit liée à l'expression de certains gènes, nous n'avons pu mettre en évidence une corrélation entre l'expression d'un de ces gènes et la permissivité d'une cellule aux parvovirus, en utilisant la technique d'hybridation différentielle de cDNAthèque.

Nous avons montré que des cellules sensibles à l'effet tueur du virus ne produisaient pas obligatoirement des particules virales infectieuses. Pour mettre en évidence que la cytotoxicité des parvovirus s'exprime bien au niveau des protéine non-structurales NS-1 et NS-2, nous avons isolé l'expression de ces protéines du contexte parvoviral en recombinant la séquence du gène NS-1/NS-2 dans le vecteur rétroviral pZipneo-SVX. Ce recombinant transfecté dans une cellule Psi 2 produit des particules rétrovirales recombinées infectieuses pouvant conférer avec succès une résistance à la neomycine et l'expression des protéines NS-1 et NS-2 à d'autres systèmes cellulaires (transduction). Nous avons ainsi montré que la protéine NS-2 exprimée seule ne développait pas de cytotoxicité à l'opposé de la protéine NS-1.

SOMMAIRE

	Page
<u>RESUME</u>	5
<u>INTRODUCTION</u>	11
1. LES PARVOVIRIDAE	12
1.1. CLASSIFICATION DES PARVOVIRIDAE	12
1.2. PATHOLOGIES ASSOCIEES AUX PARVOVIRUS AUTONOMES	14
1.2.1. PATHOLOGIE GENERALE	14
1.2.2. PARVOVIRUS ET CANCER	16
1.3. CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES GENERALES	17
1.4. CHOIX DES SYSTEMES VIRAUX MVM ET H-1	18
2. LES PARVOVIRUS AUTONOMES MVM ET H-1	19
2.1. GENERALITES	19
2.2. ORGANISATION GLOBALE DES GENOMES DE H-1 ET MVMp	20
2.3. LE CYCLE PARVOVIRAL DE MVMp	21
2.3.1. INFECTION DE LA CELLULE PAR LE PARVOVIRUS	21
2.3.2. REPLICATION DE L'ADN PARVOVIRAL	22
2.3.3. ENCAPSIDATION ET RELARGAGE DES VIRUS NEOSYNTHESES	25

2.4.	INTERACTIONS CELLULE-PARVOVIRUS	26
2.5.	RÔLE DES PROTEINES NON-STRUCTURALES	28
2.5.1.	RÔLE DE LA PROTEINE NON-STRUCTURALE NS-1	29
2.5.1.1.	AMPLIFICATION DE L'ADN	29
2.5.1.2.	REGULATION DE LA TRANSCRIPTION	29
2.5.2.	RÔLE DE LA PROTEINE NS-2	30
2.5.3.	CYTOTOXICITE DES PROTEINES NS-1 ET NS-2	31
3.	ONCOSUPPRESSION EXERCEE PAR LES PARVOVIRUS	34
4.	CONCLUSION ET PROJET	38

METHODES

5.	TECHNIQUES	
5.1.	Production et purification de parvovirus	41
5.2.	Titration de virus par hémagglutination	42
5.3.	Titration de virus en "plaque-assay"	42
5.4.	Clonogénicité des cellules sur support plastique	43
5.5.	Survie cellulaire	43
5.6.	Adsorption de virus	43
5.7.	Dispered cell assay	44
5.8.	Conversion in vitro du parvovirus MVMp	44
5.9.	Extraction d'ADN extra-chromosomal (B. Hirt)	45
5.10.	Southern blot	45
5.11.	Sonde nucléique radioactive nick-translatée	46
5.12.	Hybridation d'une membrane de nitrocellulose	46
5.13.	Extraction des ARN totaux	47
5.14.	Northern blot	47
5.15.	Purification des ARN poly A+	47
5.16.	Construction d'une cDNAtèque	48
5.17.	Hybridation liquide	49
5.18.	Chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite	49
5.19.	Sélection des clones cDNA	50
5.20.	Préparation de gros stocks de phages	50
5.21.	Transfection de cellules eucaryotes	51
5.22.	CAT ASSAY	51
5.23.	Immunoprécipitation de protéines	52
5.24.	Electrophorèse de protéines	53
5.25.	Western blot	54

SENSIBILISATION DES CELLULES TRANSFORMEES A L'INFECTION PARVOVIRALES

6.	SENSIBILITE AUX PARVOVIRUS ET TRANSFORMATION MALIGNNE	56
6.1.	INTRODUCTION	56
6.2.	LIGNEES CELLULAIRES	57
6.3.	RESULTATS	57
6.3.1.	SENSIBILITE AUX PARVOVIRUS	57
6.3.2.	INTERNALISATION DES VIRUS	58
6.3.3.	REPLICATION DE L'ADN PARVOVIRAL	58
6.3.4.	PRODUCTION DE VIRUS INFECTIEUX	59
6.4.	CONCLUSIONS	60

RELATION ENTRE TRANSFORMATION MALIGNNE ET SENSIBILITE AUX PARVOVIRUS

7.	SYNTHESE DIFFERENTIELLE DE FACTEURS CELLULAIRES EN FONCTION DE LA TRANSFORMATION CELLULAIRE	63
7.1.	HYPOTHESE	63
7.2.	PRINCIPE DE L'HYBRIDATION DIFFERENTIELLE D'UNE cDNATHEQUE	63
7.3.	SYSTEMES CELLULAIRES	65
7.4.	RESULTATS ET CONCLUSIONS	66

**TRANSDUCTION DES PROTEINES NON-STRUCTURALES DU
PARVOVIRUS MVMp PAR DES RETROVIRUS RECOMBINANTS**

8.	ETABLISSEMENT D'UN SYSTEME CELLULAIRE PRODUISANT DES PARTICULES RETROVIRALES INFECTIEUSES RECOMBINEES N'EXPRIMANT QUE LES PROTEINES NON-STRUCTURALES DU PARVOVIRUS MVMp	69
8.1.	CHOIX DU SYSTEME	69
8.2.	CONSTRUCTIONS DES RECOMBINANTS	71
8.3.	VERIFICATION IN VITRO DE L'EXPRESSION PARVOVIRALE	73
8.4.	TRANSFECTION ET SELECTION	74
8.5.	PRODUCTION DE PARTICULES RETRO-PARVOVIRALES	75
8.6.	SYNTHESE DES PROTEINES PARVOVIRALES	77
8.7.	EFFETS BIOLOGIQUES DES PROTEINES PARVOVIRALES	78
8.7.1.	EFFET CYTOTOXIQUE	78
8.7.1.1.	SYSTEMES CELLULAIRES PSI 2	79
8.7.1.2.	SYSTEMES CELLULAIRES NIH 3T3 ET A9	80
9.	CONCLUSIONS	81
9.1.	SYSTEMES CELLULAIRES STABLES	81
9.2.	ANALYSE PROTEIQUE	81
9.3.	IMPACTS CELLULAIRES ET MOLECULAIRES	83
9.4.	PERSPECTIVES	84

<u>CONCLUSION GENERALE</u>	86
-----------------------------------	----

<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	89
-----------------------------	----

ANNEXE

Jan. J Cornélis, **Paul Becquart**, Nadine Duponchel, Nathalie Salomé, Bernard L. Avalosse, Masayoshi Namba and Jean Rommelaere (1988). Transformation of Human Fibroblasts by Ionizing Radiation, a Chemical Carcinogen, or Simian Virus 40 Correlates with an Increase in Susceptibility to the Autonomous Parvoviruses H-1 Virus and Minute Virus of Mice.

Journal of Virology, **62**, 1679-1686. 110

Paul Becquart, Jean-Marc Vanacker, Nadine Duponchel, Agnès Bègue and Jean Rommelaere (1993). Expression of the Non-Structural Proteins of Parvovirus MVMp from Recombinant Retroviruses : Predominant Role of the Parvoviral NS-1 Product in Host Cell Perturbation.

Research in Virology. **Soumis**. 119

INTRODUCTION

Genre des Parvovirus autonomes

RV	Kilham rat virus	sarcome de foie de rat (1959)
H-1	Hamster osteolytic virus	tumeur transplantée Humaine HEP-1 (1960)
RT	RT virus	Rat AT permanent cell line (1967)
TVX	Tumor virus	lignée de cellules tumorales établie (1971)
MVM	Minute virus of mice	stock d'adénovirus de souris (1966)
LuIII	LuIII virus	lignée cellulaire établie humaine Lu 106 (1971)
B19	B19 virus	Serum de sang de donneur asymptomatique humain(1975)
BPV	Bovine parvovirus	fèces de veau (1961)
PPV	Porcine parvovirus	stock de virus cholérique de porc (1966)
FPV	Feline parvovirus	
	variants à spécificité d'hôte	
-FPLV	Feline panleukopenia virus	rate de Leopard (1965)
-MEV	Mink enteritis virus	rate et foie de vison (1952)
-CPV	Canine parvovirus	fèces de chien (1979)
LPV	Lapine parvovirus	fèces de lapin (1977)
ADV	Aleutian mink disease virus	tissus de vison (1973)
GPV	Goose parvovirus	tissus d'oie (1973)
	membres possibles	
MVC	Minute virus of canines	fèces de chien (1968)
HB	HB virus	tumeurs et placentas humains (1964)
RA-1	-----	-----

Genre des Dependovirus (défectif)

AAV-1	Adeno-associated virus type 1	stock de virus simien 15 (macaque rhesus) (1865)
AAV-2	Adeno-associated virus type 2	stock d'adénovirus 12 humain (souche H.M.) (1966)
AAV-3	Adeno-associated virus type 3	stock d'adénovirus 7 humain (sources H.K. et T) (1966)
AAV-4	Adeno-associated virus type 4	stock de virus simien 12 (singe vert africain) (1967)
AAV-5	Adeno-associated virus type 5	lésion condylomateuse pénienne (1984)
BAAV	Bovine adeno-associated virus	stock d'adénovirus bovin 1 (1970)
CAAV	Canine adeno-associated virus	stock de virus hépatique canin (1969)
AAAV	Avian adeno-associated virus	stock de virus bronchitique de caille (1967)
	membres possibles	
EAAV	Equine adeno-associated virus	-----
OAAV	Ovine adeno-associated virus	fèces de mouton (1979)

Genre des Densovirus (insectes)

Galleria DNV	-----	chenille de Galleria mellonella (1964)
Junonia DNV	-----	chenille de Junonia coenia (1972)
Agraulis DNV	-----	-----
Bombyx DNV	-----	-----
	membres possibles	
Aedes DNV	-----	-----
Acheta DNV	-----	-----
Sibine DNV	-----	-----
Diatraea DNV	-----	-----
Pieris DNV	-----	-----
Leucorrhinia DNV	-----	-----
Periplanata DNV	-----	-----
Simulium DNV	-----	-----

Tableau 1: Classification et origine des membres de la famille des Parvoviridae
(d'après Cotmore et Tattersall 1987)

1. LES PARVOVIRIDAE

1.1. CLASSIFICATION DES PARVOVIRIDAE

Les Parvoviridae comptent parmi les plus petits virus à ADN infectant l'animal et l'Homme (Anderson et coll. 1984 - Cukor et coll. 1984 - Siegl 1984).

Cette famille de virus lytiques est scindée en trois genres (Tableau 1) :

Les DENSOVIRUS qui n'infectent que les insectes.

Ces virus sont autonomes. Le principal intérêt développé à leur rencontre réside dans le fait qu'ils puissent être utilisés en tant que vecteurs d'expression eucaryote in vitro (Giraud et coll. 1991) à l'image des Baculovirus.

Les DEPENDOVIRUS ou Virus Adeno-Associés (AAV) (Berns et coll. 1987a - 1987b pour revues) diffèrent des parvovirus autonomes pour leur dépendance d'une co-infection par un virus helper pour assurer leur réplication et leur propagation. Ces virus helper sont de type Adénovirus, Herpès virus ou Vaccinia virus (Siegl 1984 - Schlehofer et coll. 1986). Récemment les gènes "aidant" du virus de l'herpès du dindon (THV) qui induisent la réplication de l'AAV aviaire (Bauer et coll. 1986) furent isolés et sont en cours d'identification (Weindler et coll. 1991). En absence de virus helper, l'infection d'une cellule par un AAV se solde par l'intégration ciblée du génome viral au sein du génome cellulaire (chromosome 19 chez l'homme) (Kotin et coll. 1990 - Samulski et coll. 1991 - Waltz et coll. 1992a). La surinfection par un virus helper se traduit par la réplication et l'expression du génome de l'AAV suivi du relargage de nouvelles particules infectieuses après la lyse cellulaire.

A l'opposé des Parvovirus autonomes, les AAV ne semblent ni engendrer ni être associés à une quelconque pathologie chez l'hôte qu'ils infectent (Georg-Fries et coll. 1984). Bien au contraire, ces virus interfèrent avec leur virus helper (Kirchstein et coll. 1968), récemment Rittner et coll. (1992) montrèrent que l'AAV-2 humain inhibait la réplication du virus HIV-1. D'autres auteurs relevèrent des interférences avec certains processus de transformation maligne (Labow et coll. 1987 - Katz et coll. 1986) ou de stress génotoxique (Yakobson et coll. 1987 - Yalkinoglu et coll. 1988). C'est dans cet esprit que Waltz et coll. (1992b) montrèrent qu'in vivo les AAV sensibilisaient les cellules tumorales à l'action cytocide des rayons gamma, cette propriété pourrait permettre d'augmenter l'efficacité de la radiothérapie des cellules tumorales humaines.

L'ensemble de ces caractéristiques et propriétés sont actuellement exploitées pour mettre en place un système d'expression basé sur la construction de virus recombinés (West et coll. 1987), non pathogènes, capables de s'intégrer sans dommage dans le génome cellulaire de la cellule hôte dans le but d'obliger celle-ci à synthétiser une ou plusieurs protéines déficientes auparavant (Tratschin et coll. 1984). Dans cette optique, plusieurs gènes furent transduits de cette façon in vitro: résistance à la néomycine (Hermonat et coll. 1984 - McLaughlin et coll. 1988), chloramphénicol acétyltransférase (Mendelson et coll. 1988), cDNA de la β -globine humaine (Ohi et coll. 1990 - Dixit et coll. 1991). Les auteurs de ces travaux pensent qu'un tel vecteur viral peut apporter une contribution importante dans l'élaboration de moyens thérapeutiques destinés à corriger des déficiences d'ordre génétique chez l'homme.

Les PARVOVIRUS AUTONOMES sont indépendants de tous virus helper et ne s'intègrent pas dans le génome cellulaire. Ils infectent un grand nombre d'espèces vertébrées. Ces virus engendrent certains symptômes et/ou profitent de l'établissement de certaines pathologies de l'hôte pour se propager (cf. 1.2.).

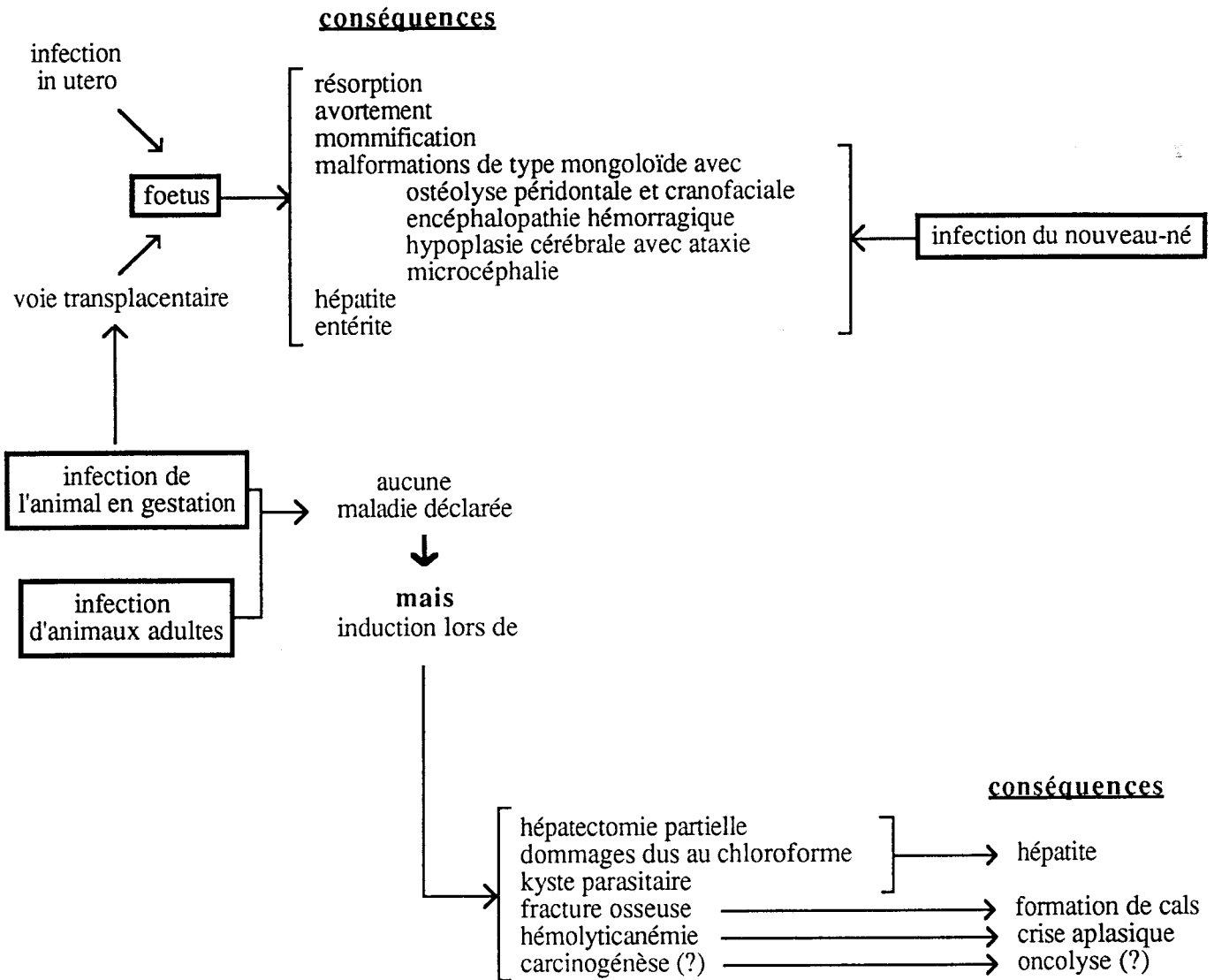


Figure 1 : Spectre pathologique des Parvovirus autonomes
(d'après Tattersall et Ward 1978)

1.2. PATHOLOGIE ASSOCIEE AUX PARVOVIRUS AUTONOMES

1.2.1. PATHOLOGIE GENERALE

La stricte spécificité d'hôte manifestée par la plupart de ces virus (MVM souris, H-1 hamster et homme, B19 homme, KRV rat, etc. ...) est fonction de la nature des protéines de capside (Antonietti et coll. 1988 - Ball-goodrich et coll. 1992). L'infection, in vivo, par les Parvovirus autonomes s'effectue soit de manière horizontale (contact avec les sécrétions nasales, salivaires, les fèces d'un individu infecté) soit de manière verticale via le placenta (Siegl 1976 - 1984). Les syndromes engendrés, chez l'hôte non protégé, sont peu fréquents et bénins chez l'adulte, dramatiques chez l'embryon et le nouveau-né (Figure 1.).

L'hôte adulte est peu affecté par une infection parvovirale. La virémie (propagation virale) ne peut être décelée que fortuitement lors de fracture osseuse (Baer et coll. 1971) ou d'hépatectomie partielle (Ruffolo et coll. 1966), dans ces cas le parvovirus interfère avec la régénérescence tissulaire. En effet, les cellules des tissus intéressés développent une grande activité mitotique permettant ainsi la propagation rapide du virus ce qui entraîne un ralentissement important de la croissance tissulaire globale chez des sujets non protégés ou déficients immunitaires. Il en est de même au niveau des tissus lymphoïdes et spléniques, une anémie transitoire peut être accentuée par une infection parvovirale.

<u>HOTE</u>		<u>INFECTION PAR H-1</u>			<u>EFFETS PATHOGENES</u>	
<u>Espèce</u>	<u>Age</u>	<u>Dose</u>	<u>Voie</u>	<u>Site</u>	<u>Signes cliniques</u>	<u>Autopsie</u>
rat	<10 j	10 ⁷ pfu	ip/sc/ic	foie, rate intestin, etc	70% mortalité (7 à 14 pi)	inclusions intranucléaire dans foie ± autres organes ulcérations hémorragiques du tractus gastro-intestinal nécrose du foie, tissu adipeux péricardite, orchite
hamster	1 j	10 ⁶ pfu	sc		syndrome ostéolytique pour 35% des animaux survie normale	inclusions intranucléaires dans fibroblastes périodontaux
hamster	4-6 m	5.10 ⁷ pfu	ip	foie, intestin		hépatite modérée et transitoire (2-4 semaines pi)
souris nude	7 s	4.10 ⁶ -10 ⁸ pfu	sc/iv	tumeurs implantées		microsplénie
souris nude		10 ⁷ pfu	ip			nécrose hépatique mineure

j : jours
 s : semaine
 m : mois

pfu : particule infectieuse
 ip : intrapéritonéale
 sc : sous cutanée

ic : intra cérébrale
 pi : post infection
 iv : intra veineuse

Tableau 2 : Effets secondaires du parvovirus H-1 chez l'animal

En cas d'infection intra-utérine, la pathologie engendrée par ces virus dépend essentiellement de l'âge du fœtus. Ainsi in utero, l'infection très précoce de hamsters par le parvovirus H-1 engendre des syndromes généralisés conduisant le plus souvent à un avortement spontané ou à une résorption, dans le cas contraire les nouveau-nés présentent des anomalies congénitales importantes aux niveaux encéphaliques, osseux, hépatique etc. L'infection de hamsters nouveau-nés par le parvovirus H-1 conduit, dans 35 % des cas, à un retard de croissance accompagné de syndromes osseux de type mongoloïde (funny face) (Toolan 1960), chez le chien et le vison une entérite foudroyante se développe (Siegl 1984), le jeune rat (non protégé) est lui-même très sensible à l'action pathogène du parvovirus H-1 pour lequel on observe jusqu'à 70 % de mortalité due essentiellement à une attaque générale du tractus gastro-intestinal (Tableau 2).

Chez l'homme, l'infection par le parvovirus B19 provoque un érythème infectieux bénin chez l'enfant (5^{ème} maladie de l'enfant) souvent confondu avec la rubéole (Anderson et coll. 1983 - 1984). En cas d'anémie hémolytique, le B19 provoque des crises aplasiques (Pattison et coll. 1981), en exerçant un tropisme particulier pour les précurseurs de la lignée érythroïde (Mortimer et coll. 1983) et secondairement pour les cellules du myocarde (Porter et coll. 1988) et les granulocytes circulants (Kurtzman et coll. 1988). Le B19, comme tous les parvovirus, est peu dangereux et infecte très souvent de façon asymptomatique, on estime que 30 à 60 % de la population anglaise a développé une virémie à B19. Bien qu'il fût constaté qu'il puisse être responsable de quelques rares cas d'avortements spontanés chez la femme (Morinet 1987 - Brown et coll. 1989 - Pattison 1989) ceci n'est pas généralisable, en effet Faden et coll. (1992) étudièrent récemment le cas d'une femme qui, bien qu'infectée chroniquement depuis 4 années par le B19, mit au monde un enfant en bonne santé et exempt de B19. Ceci impliquerait que la réponse immunitaire de la patiente, caractérisée constamment par

<u>Origine</u>	<u>Agent transformant</u>	<u>Animal hôte</u>	<u>Parvovirus autonomes</u>	<u>AAV</u>	<u>Référence</u>
<u>cellules transplantées^b</u>			<u>Activité antinéoplasique^a</u>		
hamster	Ad5	hamster		AAV-2 : +	Ostrove 1981
hamster	Ad12	hamster		AAV-2 : +	de la Maza 1981
hamster	HSV-2	hamster		AAV-1 : +	Cukor 1975 Blacklow 1978
hamster	SV40	hamster		AAV-1 : -	Cukor 1975 Blacklow 1978
hamster	DMBA	hamster		AAV-2 : -	Ostrove 1981
hamster	DMNA	hamster		AAV-1 : -	Blacklow 1978
souris	c-Ha-ras	souris nude		AAV-2 : +	Katz 1986
souris	Ascites	souris	MVMp : +		Guetta 1986
chien	sarcome vénérien transmissible	chien	CPV : + FPV : +		Yang 1987 Yang 1987
humain	SV40	souris nude	H-1 : +		Dupressoir 1989
<u>virus tumorigènes^c</u>					
	Ad2, 12, 31	hamster	H-1 : +	AAV-1 : + AAV-2 : +	Kirschstein 1968 Toolan 1968 de la Maza 1981
	SV40, MoMuLV	hamster rat	H-1 : + RV : +	AAV-1 : -	Siegl 1984 Mayor 1973 Bergs 1969
<u>Carcinogène chimique^c</u>					
	7,12 DMB(a)A	hamster	H-1 : +		Toolan 1982

a + : plus de 50% d'inhibition de la transformation.

- : différence non significative.

b : parvovirus inoculé dans cellules tumorales avant implantation ou dans animal lors de l'implantaion

c : parvovirus inoculé dans nouveau né lors de ou avant le traitement tumorigénique

**Tableau 3: Inhibition par les parvovirus de la tumorigénèse induite
(Rommelaere et Tattersall 1988)**

un taux important d'IgM, contrôlerait suffisamment la réplication du parvovirus pour prévenir une infection foetale.

1.2.2. PARVOVIRUS ET CANCER

Les parvovirus H-1 et MVM furent tout d'abord isolés de stocks de virus transformants (Hartley et coll. 1960) ou de tumeurs malignes. Présupposés à l'origine comme virus transformants, ces virus infectent en fait ces tumeurs préétablies pour assurer leur propagation (Toolan et coll. 1967). Par ailleurs, Toolan (1968 - 1982) constata que, chez des nouveau-nés de hamster ayant survécu à l'infection parvovirale, l'émergence de tumeurs spontanées ou induites par des agents chimiques ou viraux était 5 à 25 fois moindre par rapport à des animaux contrôles non infectés. D'autres travaux montrèrent que les parvovirus autonomes ainsi que les AAV exercent un pouvoir anti-neoplasique chez l'animal (cf.3). Ainsi ces virus peuvent interférer avec l'induction de la tumorigénèse induite par des agents chimiques ou viraux mais également avec les processus d'implantation de cellules tumorigènes (Tableau 3). Dans notre laboratoire Dupressoir et coll. (1989) montrèrent que le parvovirus H-1 pouvaient interférer avec la croissance tumorale in vivo de cellules tumorigènes mammaire d'origine humaine implantées chez la souris nude (cf. 3).

L'ensemble de ces données nous laissent à penser que le parvovirus se développe préférentiellement dans des cellules peu différenciées et se divisant intensivement. Par ailleurs, que cette attaque pourrait se traduire par la lyse spécifique de ces cellules. Les travaux de Toolan indiquent que la cellule transformée (cancéreuse) est une cible potentielle des parvovirus.

C'est pourquoi l'équipe du professeur J. Rommelaere à l'institut Pasteur de Lille, au sein du laboratoire d'oncologie moléculaire dirigé par le professeur D. Stehelin, s'attache depuis 1984 à vérifier que le parvovirus autonome peut exercer un pouvoir oncosuppresseur par la lyse spécifique des cellules tumorales, transformées spontanément ou non, et donc de vérifier si ce virus effectue une oncolyse sélective de ces cellules.

1.3. CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES GENERALES

Ces virus, non enveloppés par une membrane phospholipidique, sont constitués d'une coque (capside) de protéines (capsomères) protégeant un ADN monocaténaire infectieux de 5 000 bases environ, pour un poids moléculaire de 1.2 à 2.10^6 Daltons (Singer et coll. 1978). L'agencement tridimensionnel des 32 capsomères confère à la capsidie un diamètre de 18 à 26 nm pour un poids global de 6.10^6 Daltons (Tsao et coll. 1991). Après relargage dans le milieu extra cellulaire, ces virus hémagglutinants peuvent être purifiés lors d'une ultracentrifugation isopycniqne en chlorure de césium, leur coefficient de sédimentation étant de 110 à 122 Svedberg et leur densité se situe entre 1.38 et 1.45 g/ml selon la nature du virus. La nature de leur capsidie leur confère une résistance particulière aux solvants lipidiques, à des pH allant de 3 à 9, à la chaleur (60 mn à 56°C), à la congélation et à la dessiccation (Tattersall et coll. 1978), ils sont toutefois sensibles aux radiations Ultraviolet.

La molécule encapsidée d'ADN monocaténaire des Parvoviridae, flanquée de 2 séquences palindromiques, est soit de polarité négative (complémentaire de l'ARN messenger) soit positive, les proportions sont spécifiques des virus (1 % à polarité

positive pour MVM, 50 % pour B19). L'infection d'une cellule permissive sensible se traduit d'abord par l'accumulation de nouvelles molécules d'ADN dans le noyau et de protéines parvovirales puis éventuellement par le relargage, lors de la lyse cellulaire, de nouvelles particules infectieuses.

1.4. CHOIX DES SYSTEMES VIRAUX MVM ET H-1

D'une manière générale au laboratoire nous travaillons sur les Parvovirus MVM (Minute Virus of Mice) et H-1 (Hamster Osteolytic Virus) spécifiques respectivement des cellules murines d'une part et de cellules de hamster et humaines d'autre part. Le choix de ces virus fut guidé par le fait que ceux-ci peuvent facilement être produits à partir de diverses lignées cellulaires ce qui n'était pas le cas du parvovirus humain B19. Récemment N.C. Munshi (1990) et K.E. Brown et coll. (1991) réussirent toutefois à propager ce virus de manière efficace avec respectivement une lignée de mégacaryocytes transformés humains (MB-02) et des cultures primaires de foie foetal. Cette antériorité de MVM et H-1 est enrichie par de nombreuses études à travers le monde tant sur la structure physico-chimique que sur le plan du métabolisme viral au sein de la cellule.

2. LES PARVOVIRUS AUTONOMES MVM ET H-1

2.1. GENERALITES

Ces deux virus ont un génome de 5149 bases pour MVMp (Astell et coll. 1983b) et de 5176 bases pour H-1 (Rhode et coll. 1983). L'ADN encapsidé (le plus souvent de polarité négative) est flanqué de 2 palindromes différents, lui conférant deux structures en épingle à cheveux (hairpin).

L'homologie de séquences entre MVM et H-1, d'environ 70 %, permet d'effectuer un grand nombre de parallèles entre ces deux parvovirus. Ainsi leur organisation génomique similaire leur imprime un cycle viral identique au sein de la cellule. Comme pour la plupart des parvovirus autonomes, les protéines non-structurales (NS) sont quasi identiques (Lederman et coll. 1987), la spécificité d'espèce étant due aux variations de séquences en amino-acides des protéines de capsid (Antonietti et coll. 1988). En ce qui concerne le parvovirus MVM, il existe deux souches différant par leur tropisme: MVMp exhibe un tropisme fibroblastique et MVM_i un tropisme lymphocytaire (McMaster et coll. 1981 - Tattersall et coll. 1983 - Kimsey et coll. 1986 - Ball-goodrich et coll. 1992). Ce dernier fut écarté, à raison, comme origine virale du SIDA.

Le parvovirus MVMp, étant le plus facile à produire, est de ce fait le plus étudié (Ward et Tattersall 1982 pour revue), nous détaillerons principalement celui-ci.

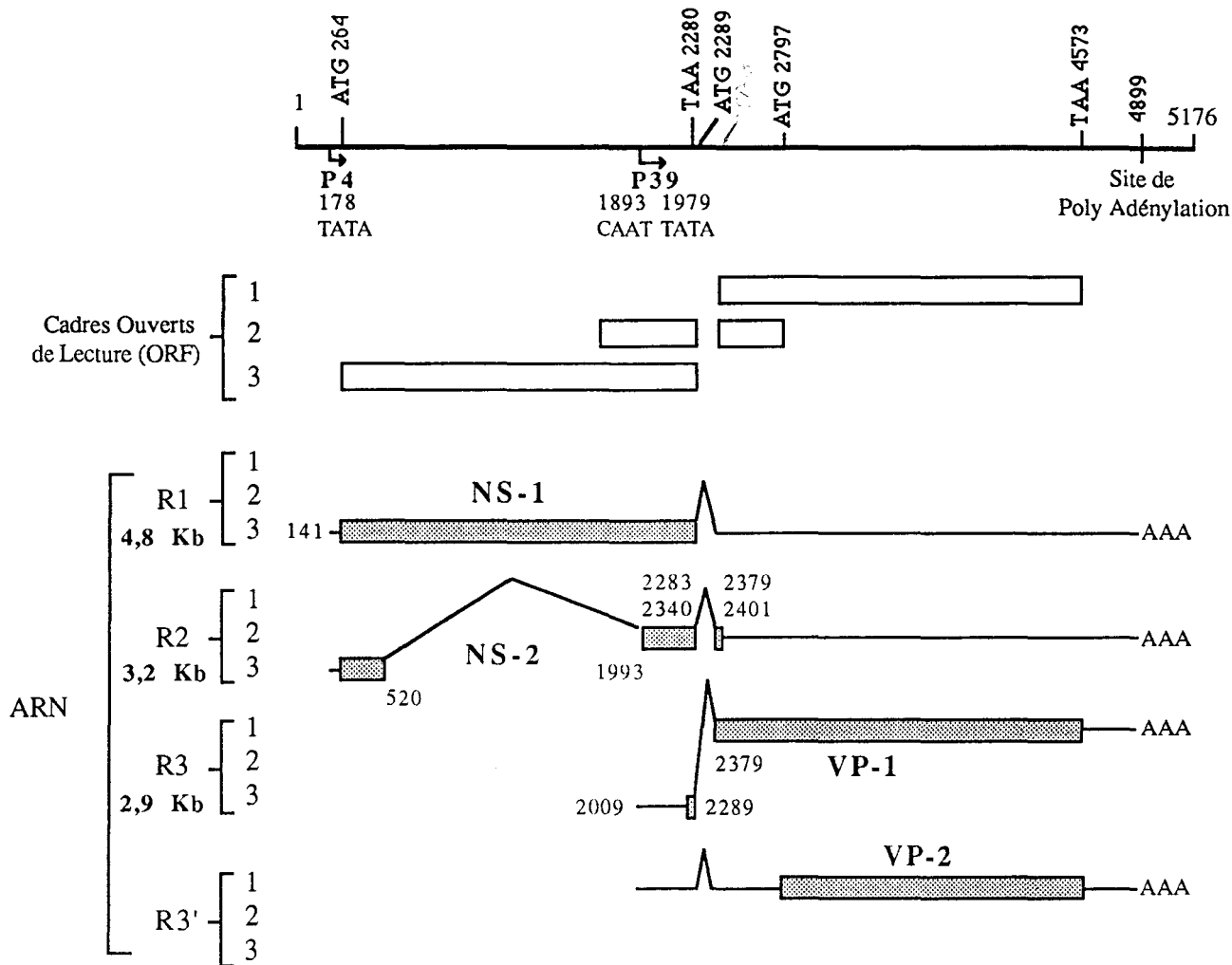


Figure 2A: Organisation génomique du parvovirus H-1
(d'après Rhode et coll. 1983)



Séquence intronique
séquence codante
Séquence polyadénylée
ADN
ARN messenger
Phase de lecture

NS-1 : 84 kD
NS-2 : 25 kD
VP-1 : 88 kD
VP-2 : 68 kD
VP-3 : 62 kD

2.2. ORGANISATION GLOBALE DES GENOMES DE H-1 ET DE MVMp

(Fig. 2 A - 2B)

L'étude de la séquence de MVMp (Astell et coll. 1983b) (et H-1) révèle l'existence de 2 unités de transcription (gauche et droite) initiées par deux promoteurs P4 et P38 (P39 pour H-1), respectivement aux nucléotides 177 et 1977 (Lebowitz et coll. 1986).

Le gène (cadre gauche) dirigé par P4 code pour les protéines non-structurales (Cotmore et coll. 1986): NS-1 et NS-2 , le gène dirigé par le second promoteur P38 (cadre droit) code pour les protéines tardives structurales (de capsid) VP1 et VP2, un nombre fini de VP2 est ensuite modifié par clivage après traduction en VP3 (Tattersall et coll. 1976a - Labienec-Pintel et coll. 1986). Le promoteur P4 dirige la synthèse de 2 ARN messagers (ARNm) précoces (Clemens et coll. 1988): R1 (4.8 kb), R2 (3.3 kb), le promoteur p38 d'un seul ARNm R3 (3.0 kb). Tous ces ARNms subissent un petit épissage obligatoire aux environs de 41 à 46 unités de génome (map unit) (Morgan et coll. 1986) et sont polyadénylés au nucléotide 4885 (Clemens et coll. 1987).

L'ARNm R1 code pour la protéine NS-1 de poids moléculaire 83 kD (kilo Daltons). La phase du cadre de lecture est déterminée sous l'appellation ORF3.

L'ARNm R2 est le résultat d'un épissage de l'ARNm R1. Cet épissage s'effectue entre les nucléotides (nt) 514 et 1990 induisant un changement de phase de lecture de l'ORF3 à l'ORF2. Cet ARN messager code pour la seconde protéine non-structurale NS-2 de 24k D. Il existe donc une identité de séquence du côté amino-terminal de 84 aminoacides entre NS-1 et NS-2.

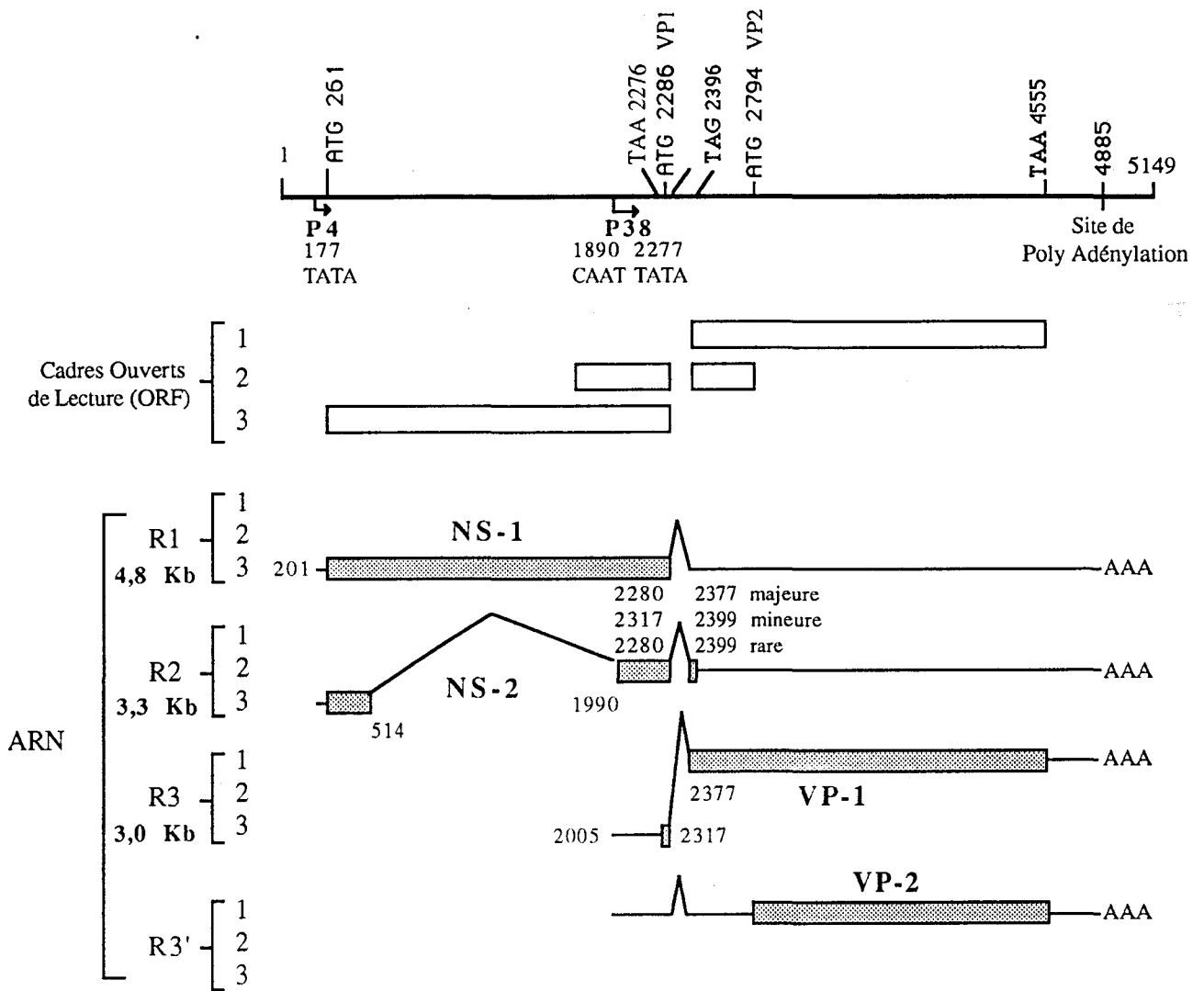
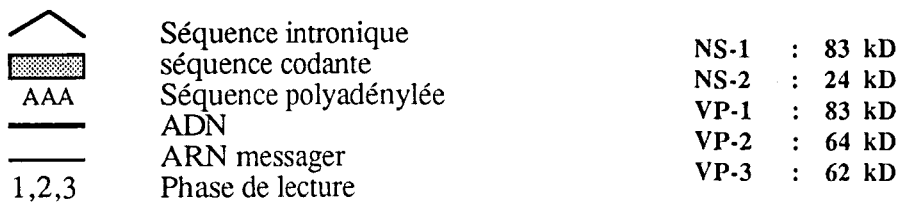


Figure 2B: Organisation du génome de MVMp
(Cotmore et Tattersall 1987)



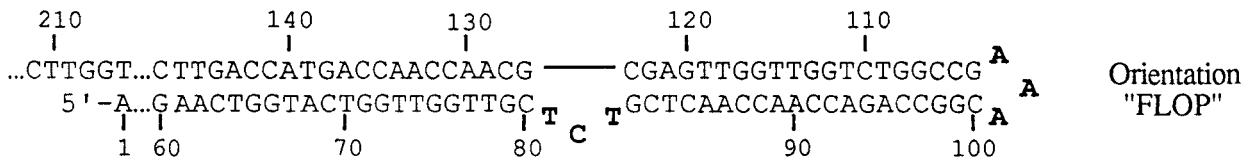
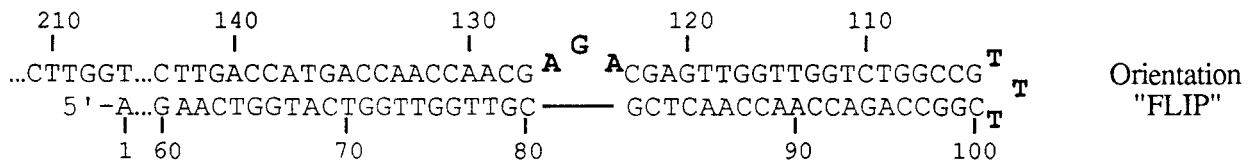
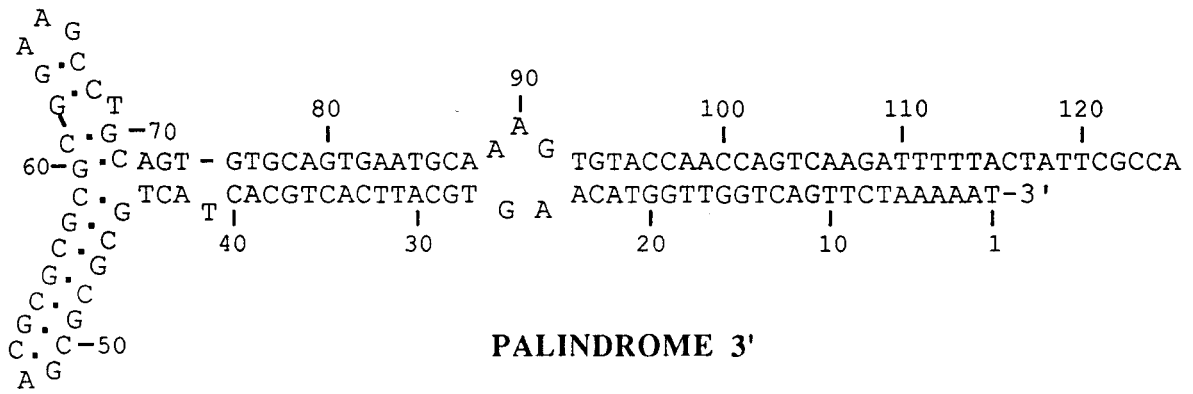
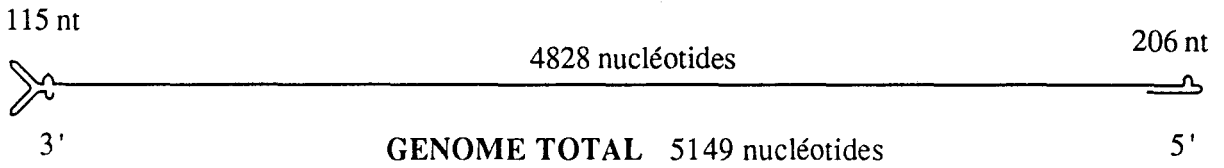
Il existe 3 isoformes de NS-2 (majeure, mineure et rare) dues à la présence de plusieurs sites donneurs (nt 2280 et 2317) et accepteurs (nt 2377 et 2399) au niveau du petit épissage obligatoire (Morgan et coll. 1986).

L'ARNm R3, généré à partir du promoteur P38, code dans l'ORF1 pour une protéine de capsid VP2 (64 kD) ou suite à un épissage alternatif de l'ORF3 à l'ORF1 pour la protéine mineure de capsid VP1 (83 kD). Au cours de l'encapsidation, le clivage protéolytique de 20 aminoacides de l'extrémité amino-terminale d'une fraction de VP2 génère une troisième protéine VP3 (62 kD). Dans l'état actuel de nos connaissances, ces protéines structurales ne semblent exercer aucun pouvoir cytotoxique, l'infection de cellules par des capsides vides n'affectant en aucun cas la croissance cellulaire (cf 9.3.). Récemment Tullis et coll. (1993) suggérèrent que la protéine VP1 intervienne au niveau des processus d'internalisation du virion et VP2 lors de l'accumulation et l'encapsidation de l'ADN parvoviral neo-synthétisé.

2.3. LE CYCLE PARVOVIRAL DE MVMp

2.3.1. INFECTION DE LA CELLULE PAR LE PARVOVIRUS

Le parvovirus se fixe préalablement sur des récepteurs membranaires ubiquitaires spécifiques (Ward et coll. 1982). Le nombre de ces récepteurs varie toutefois selon l'état de différenciation et le type cellulaire (Siegl 1984). La pénétration du virus s'effectue selon un processus classique d'endocytose (Linser et coll. 1977), in vitro, le lavage à l'EDTA d'une culture de cellules infectées, une heure auparavant, par un



PALINDROME 5'

Figure 3: Structure des extrémités de l'ADN viral de MVMP
(Cotmore et Tattersall 1987)

parvovirus radio marqué à la thymidine tritiée, permet de déterminer que l'adsorption moyenne de la population virale est de l'ordre de 40%. Le transit de ces particules virales au noyau et la décapsidation à ce niveau sont mal connus.

Le parvovirus n'induisant pas l'entrée en phase S du cycle cellulaire, on assiste à une accumulation progressive des virions au sein même du noyau. La décapsidation ne conduit pas à l'intégration de l'ADN parvoviral au sein du génome cellulaire (contrairement aux AAV).

Ce n'est qu'en phase S (Walter et coll. 1980) et sous certaines conditions d'ordre strictement cellulaire que le virus entamera la réplication de son ADN (cf. 2.3.2.), en effet la faible complexité génomique de ce virus nous incite à penser que le bon déroulement du cycle parvoviral est dépendant d'activité(s) cellulaire(s) particulière(s), par exemple l'ADN polymérase (Kolleck et coll. 1981 - 1982).

2.3.2. REPLICATION DE L'ADN PARVOVIRAL

(Berns 1991 pour revue)

La réplication de l'ADN parvoviral s'effectue dans le noyau de la cellule permissive durant la phase S et le début de la phase G2 du cycle cellulaire. A l'opposé des polyomavirus, les parvovirus ne peuvent stimuler la synthèse de l'ADN dans les cellules infectées.

L'ADN simple brin de 5149 nucléotides de polarité négative (donc extrémité 3' à gauche) est bordé de 2 palindromes de 115 bases en 3' et 206 bases en 5'. Ces 2 régions se replient sur elles-mêmes en épingle à cheveux (Fig. 3) ce qui procure une extrémité 3' OH libre à gauche qui constitue l'amorce nécessaire pour la synthèse du second brin

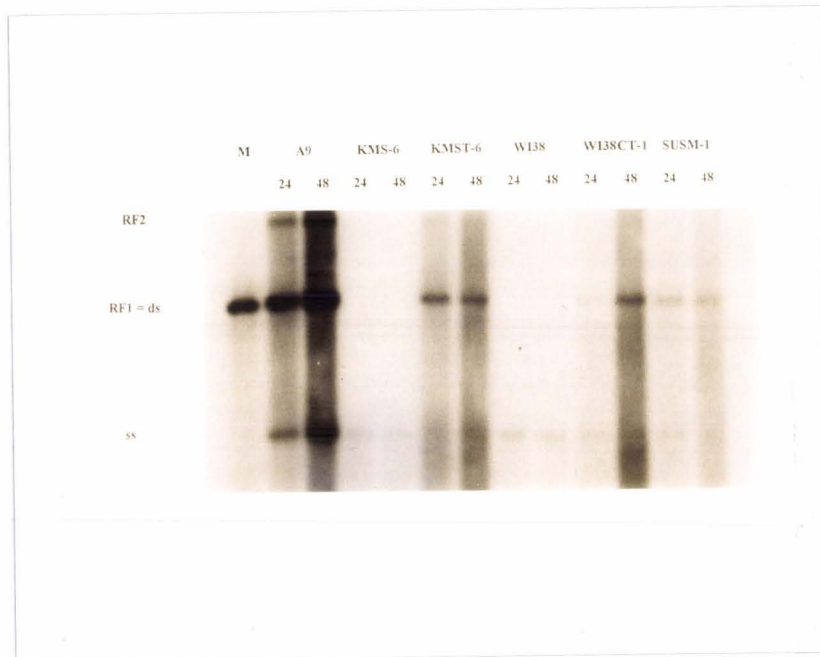


Figure 4: Réplication de l'ADN de MVMp dans les cellules normales et transformées

Les cellules ont été infectées avec du virus tritié ($2 \cdot 10^5$ cpm par culture) à M.O.I. 3. Les extraits réalisés selon la technique de B. Hirt (1967) sont préparés 24 et 48 heures après infection, séparés par électrophorèse et repérés après hybridation par une sonde ADN MVMp totale marquée au $dCTP-\alpha^{32}P$. Tous les échantillons sont chargés à concurrence de $3.6 \cdot 10^3$ cpm de virus tritié excepté pour la cellule A9 ($1.8 \cdot 10^3$ cpm). L'ADN viral convertit in vitro (ds) constitue le marqueur de taille (ligne 1 = M).

d'ADN. Cette phase de *CONVERSION* de l'ADN simple brin en double brin, aboutit à la formation d'une forme répliquative de 5 kbp appelée RF1. Il existe deux populations de RF1, "flip" et "flop", discriminées par la séquence de leur palindrome 5'. En effet la configuration "flip" est complémentaire (selon les règles de complémentarité des bases de l'ADN) de la configuration "flop" (Fig 3), ces deux configurations sont trouvées en nombre égal dans une population virale et n'influent pas sur la pathogénicité du virus (Rhode et coll. 1982).

L'électrophorèse de fractions extra-chromosomiales (Hirt 1967), radio marquées métaboliquement ou non, extraites de cellules permissives (ici: A9, KMS-T6, WI38CT1 et SUSM-1), révèle 4 formes répliquatives de l'ADN parvoviral (Fig. 4) permettant d'établir un modèle de répllication de cet ADN (Fig. 5) appelé "modified rolling hairpin" pour modèle modifié de déplacement d'épingle à cheveux (Tattersall et coll. 1976b - Astell et coll. 1985 - Cotmore et Tattersall 1987).

Ainsi durant la phase de conversion (passage 1 sur la figure 5 = 1), l'ADN viral est dupliqué en une forme répliquative double brin (RF1), de 5 kbp environ, terminée en 5' (à droite) par le palindrome replié 5'. La duplication de ce palindrome est possible après le clivage par une protéine terminale à activité endonucléasique, à 18 nucléotides en amont de l'extrémité en 5' (3), cette protéine fut reconnue comme étant NS-1 (Cotmore et coll. 1988). Cette coupure génère une extrémité 3' OH libre servant d'amorce pour terminer la répllication de l'ADN parvoviral en déplaçant l'extrémité 5' lui faisant face (forme RF1 étendue) (4 et 5).

Le palindrome droit, ainsi dupliqué, se replie à nouveau sur lui-même (hairpin) (6). La nouvelle extrémité 3' OH libre permet ainsi la continuation de la répllication de l'ADN parvoviral en prenant comme modèle (matrice) cette fois-ci le brin d'ADN néoformé, en déplaçant le site de coupure suscité (7). Cette nouvelle synthèse aboutit à

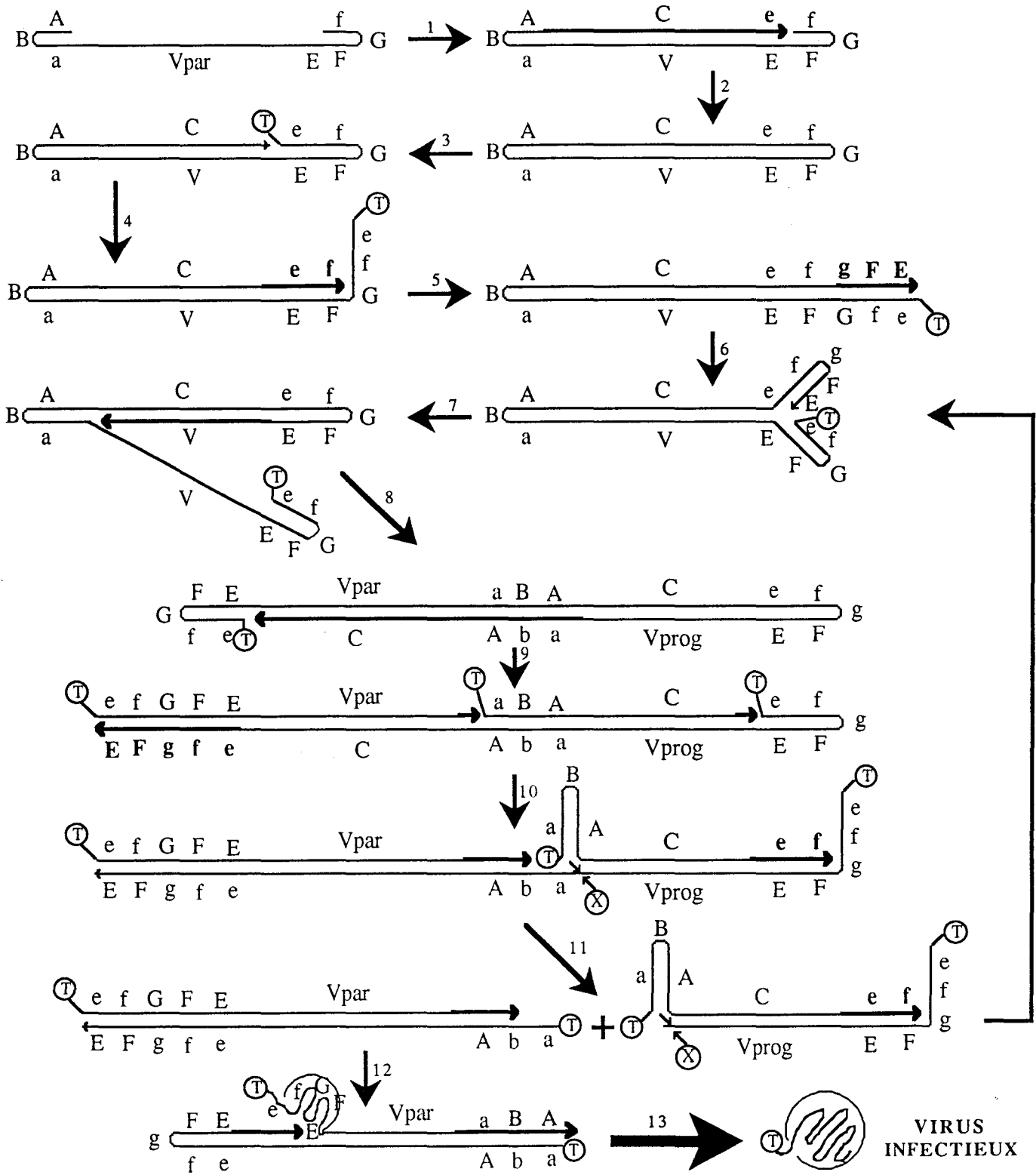


Figure 5: Modèle de répllication de l'ADN parvoviral
(d'après Cotmore et Tattersall 1987)

	ADN		Vpar	ADN viral parental (polarité -)
	ADN en cours de synthèse		Vprog	ADN viral duplicat du parental (polarité -)
	Protéine terminale (voir texte)		C	ADN complémentaire (polarité positive)
	Activité endonucléasique (voir texte)			

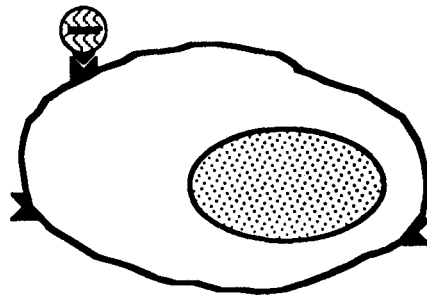
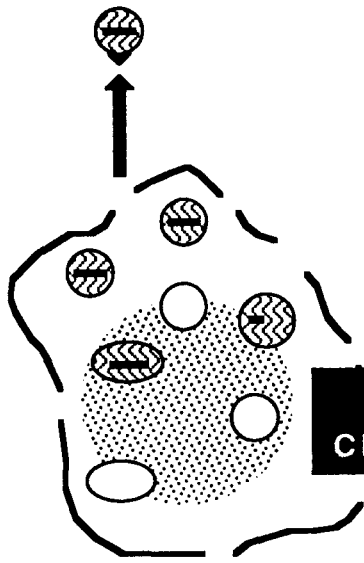
une forme répliquative dimérique double brin (RF2) (8) de 10 kbp représentant grossièrement 2 génomes parvoviraux dépliés et reliés par leur palindrome 3'. L'étape RF2 est toutefois précédée par la formation intermédiaire d'un ADN migrant à une position de 8 kbp environ (7). Il existerait en effet un pause lors de la formation de la forme RF2, celle-ci s'opérerait au niveau du palindrome central 3' (Faust et coll. 1984).

Astell et coll. (1983 - 1985) proposent que la forme RF2 soit ensuite excisée au niveau du palindrome central 3' selon un processus topoisomérique (9 et 10) pour pouvoir générer (11) d'une part un nouvel RF1 permettant la synthèse d'un nouveau RF1 (*AMPLIFICATION* des formes monomériques RF1 et dimériques RF2) (retour à l'étape 6) et d'autre part une forme monomérique RF1 (12) servant à l'établissement de la descendance virale simple brin encapsidable (13).

Il apparaît donc que l'amplification des formes RF1 permet une large production de génomes viraux encapsidables. Vu la faible complexité génomique du virus et sa dépendance à l'égard d'événements moléculaires se produisant durant la phase S du cycle cellulaire, cette répliquative est donc tributaire de facteurs cellulaires dont la nature est encore mal connue, mais également de facteurs viraux telle la protéine NS-1. Selon Cotmore et coll. (1988), cette protéine, attachée de manière covalente aux formes génomiques étendues (protéine terminale T - Figure 5), serait d'une part responsable de l'activité endonucléasique et topoisomérique pressentie au niveau de la résolution de la forme RF2 (excision asymétrique du palindrome 3' par la protéine X - Figure 5) (Astell et coll. 1983 - 1985) et d'autre part essentielle lors de l'encapsidation du génome viral neo-synthétisé (Cotmore et coll. 1989).

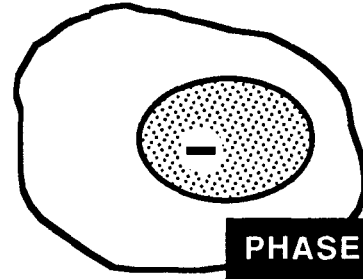
PARVOVIRUS
MATURE INFECTIEUX

ADSORPTION



PENETRATION
DECAPSIDATION

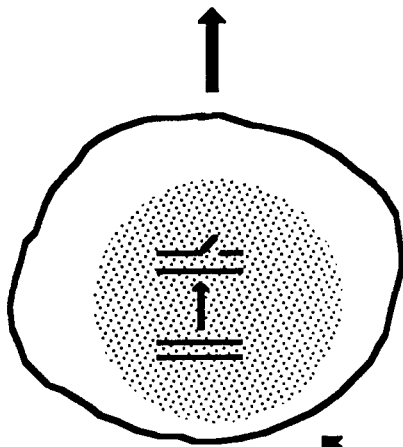
LYSE
CELLULAIRE



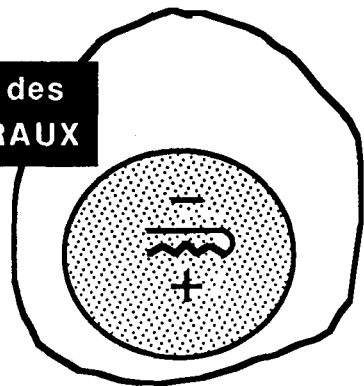
PHASE S

ASSEMBLAGE DE
PARTICULES VIRALES
(VIDES, DEFECTIVES, PLEINES)

CONVERSION de l'ADN VIRAL

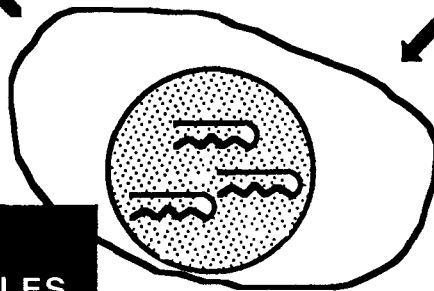


SYNTHÈSE des
ARNm VIRAUX



NEOGENÈSE d'ADN
VIRAL SIMPLE BRIN

SYNTHÈSE des
PROTEINES VIRALES



AMPLIFICATION DE
L'ADN PARVOVIRAL

Figure 6. Cycle lytique du Parvovirus MVM

2.3.3. ENCAPSIDATION ET RELARGAGE DES VIRUS NEOSYNTHESES

L'assemblage des virions s'effectue dans le noyau 20 à 30 heures après l'infection. La population virale se répand alors dans le cytoplasme extrêmement désorganisé par le détournement des fonctions cellulaires au profit du cycle parvoviral. Le relargage des virions est effectué lors de la lyse cellulaire.

La production virale est très variable selon le type cellulaire (Tableau 4 page 26), allant de zéro à plusieurs centaines de particules infectieuses par cellule avec un rapport global d'une particule infectieuse pour 300 virions. Cette production n'est pas corrélée avec l'amplification de l'ADN parvoviral: cas exemplaire de la cellule SCC 25.

Il s'agit donc d'un cycle lytique (Figure 6); toutefois dans notre laboratoire nous disposons d'un système cellulaire NRK src ts dont l'état de transformation est modulable selon la température (Salomé et coll. 1989). A température restrictive on observe l'accumulation, dans de vastes vacuoles, d'un grand nombre de particules infectieuses relarguées par exocytose sans lyser la cellule. Ce processus permet ainsi une production très efficace de 41.10^5 particules infectieuses par cellule. A température permissive le cycle parvoviral se termine classiquement par la lyse cellulaire accompagnée du relargage de 5.10^5 particules infectieuses par cellules soit 8 fois moins. La nature de ce relargage sans lyse cellulaire ainsi que la raison de différence d'efficacité de production virale entre les deux phénotypes sont encore actuellement inconnus.

CELLULES	ORIGINE	AGENT TRANSFORMANT	TAUX	DCA	PRODUCTION	SURVIE
			D'ADSORPTION	(b)	VIRALE	CELLULAIRE
Fibroblastes embryonnaires humains						
KMS-6	embryon total	-	33	16	0,3	75
KMST-6	embryon total	Gamma	38	1330	0,2	7
WI 38	poumon	-	18	14	0,25	90
WI 38CT1	poumon	Gamma	37	190	14,5	20
MRC-5	poumon	-	44	28	0,5	68
MRC-5V1	poumon	SV40	50	1850	20	2
SUSM-1	foie	4-NQO	38	335	305	22
Cellules humaines						
NB-E	rein de nouveau né	SV40	35	2160	550	1
HT1080	fibrosarcome	spontané	38	635	50	5
VH10	fibroblaste	-	nd	7	nd	40
VH10-SV	fibroblaste	SV40	nd	95	nd	0,4
NHK	kératinocyte	-	nd	2	nd	85
HaSV	kératinocyte	SV40	nd	28	nd	0,4
HaCat	kératinocyte	spontané	nd	8	nd	22
HaCat10R2	kératinocyte	spontané	nd	6	nd	90
HaCat-EJ	kératinocyte	c-Ha ras	nd	6	nd	24
SSC-25	kératinocyte	spontané	nd	200	nd	0,1
HMEC	mammaire	-	39	1	nd	88
HBL100	mammaire	SV40	40	600	142	23
MCF7	mammaire	spontané	34	10	1	35
T47D	mammaire	spontané	44	20	1	45
Cellules murines						
A9	lignée L	variant	38	1750	10 ⁴	40
NRK	rein	-	nd	7	nd	95
NRKts339	34,5°C	v-src-ts	19	470	5 10 ⁵	6
	39,5 °C	v-src-ts	17	1200	41 10 ⁵	90
NSR1	rein	v-src	nd	nd	nd	87
208F	fibroblaste	-	nd	35	nd	70
AT1a	fibroblaste	AEV	nd	35	nd	35
FR3T3	fibroblaste	-	nd	549	nd	86
FSR13	fibroblaste	v-src	nd	nd	nd	1,5
FRMC1	fibroblaste	v-myc	nd	nd	nd	25
FRSV4	fibroblaste	SV40	nd	nd	nd	16,5
FRBP8	fibroblaste	BPV-1	nd	nd	nd	95
FRBP-8EJ1	fibroblaste	BPV-1+ras	nd	nd	nd	11

Tableau 4: Paramètres déterminant la permissivité aux parvovirus autonomes des cellules normales et transformées (cf. Méthodes)

(d'après: Cornélis et coll. 1988a - 1988b / Chen et coll. 1989 / Dupressoir et coll. 1989 / Salomé et coll. 1989 - 1990)

- a) : (%) Fraction de la population virale adsorbée par la membrane cytoplasmique
b) : Rapport de la quantité d'ADN viral entre 2 et 30 heures après infection à M.O.I. 10⁻¹
c) : (particules infectieuses par culture) Rapport de production virale entre 2 et 30 heures après infection à M.O.I. 10⁻¹
d) : (%) Fraction de cellules vivantes 5 jours après infection à M.O.I. 10

En conclusion, au vu des résultats obtenus au laboratoire depuis 1984 dont certains sont repris dans le tableau 4, il apparaît que globalement la transformation maligne d'une cellule soit une condition nécessaire mais insuffisante pour permettre une production efficace de parvovirus autonomes.

2.4. INTERACTIONS CELLULE-PARVOVIRUS

Il existe vis-à-vis du parvovirus deux types cellulaires: résistant et sensible (ou permissif). Lors de l'infection de cellules résistantes, on assiste à une faible mortalité cellulaire, de 1 à 20 % (Tableau 4) et la croissance cellulaire est peu affectée. Le taux d'amplification de l'ADN parvoviral est faible, d'un facteur 1 à 30, et la production de particules infectieuses est nulle (WI 38 et MRC-5). Ceci s'accompagne de taux très faibles de transcription et traduction notamment pour les protéines de capsid (Cornélis et coll. 1988b), c'est la cas typique d'une infection cryptique. Si les taux de transcription et traduction sont significatifs (cas de la cellule 208 F - Cornélis et coll. 1988b), la résistance de la cellule est probablement due à la mise en place dans le déroulement du cycle parvoviral d'une (ou plusieurs) barrière(s) dont la nature reste à définir.

Si la cellule normale est résistante, la transformation maligne de celle-ci entraîne la mise en place de processus biologiques qui la rendent sensible à l'action lytique des parvovirus (Mousset et coll. 1982). Comme le suggère le tableau 4, cette acquisition de la sensibilité peut se réaliser quelque soit l'agent causal (Fig. 7): chimique, physique (Cornélis et coll. 1988a), viral (Faisst et coll. 1989) et oncogénique (Mousset et coll. 1986 - Salomé et coll. 1990 - Legrand et coll. 1992).

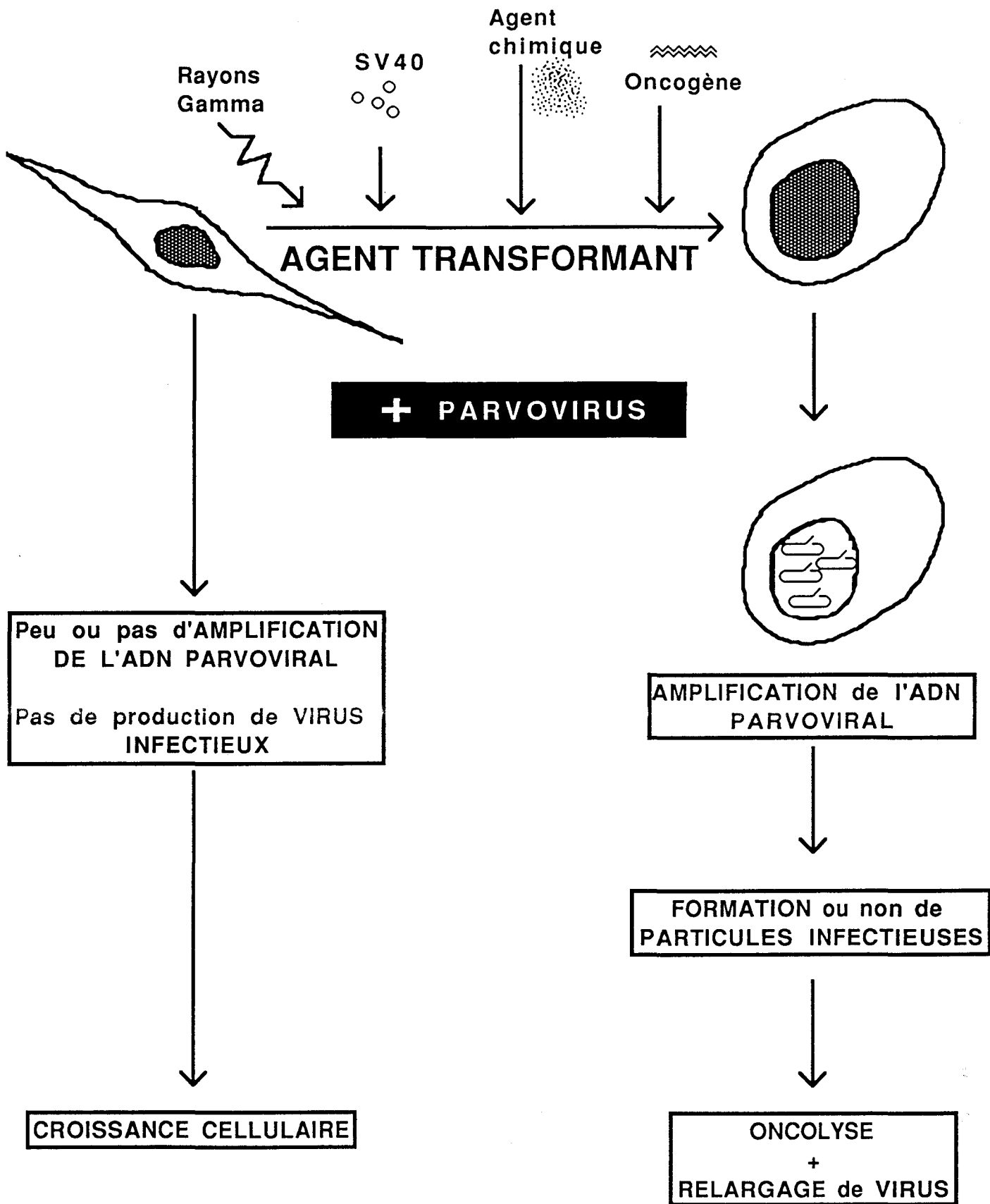


Figure 7. SENSIBILISATION CELLULAIRE *in vitro* AU PARVOVIRUS

L'infection d'une cellule permissive se manifeste par des signes évidents de souffrance cellulaire 10 heures suivant l'infection: rétraction cellulaire (réfringence accrue), condensation de l'hétérochromatine et de la chromatine, désorganisation du nucléole avec apparition de vacuoles intranucléaires, rupture de la membrane cytoplasmique (Singer et coll. 1978 - Matthews 1982). In vitro cette sensibilité se traduit par une mortalité importante de 40 à 99.9 % dans les 20 à 30 heures après l'infection. Cette mortalité est en corrélation avec un haut taux d'amplification de l'ADN parvoviral (ainsi la cellule NBE est sensible à 99 % et amplifie 2160 fois l'ADN parvoviral de H-1), avec une stimulation de l'initiation de la transcription (Spegelaere et coll. 1991), une plus grande accumulation des différentes espèces d'ARNm (2.5 à 3 fois), une activité accrue des promoteurs parvoviraux (4 à 9 fois) et une augmentation (2.5 fois) du taux intracellulaire des protéines non-structurales NS-1 et NS-2 comme le montrèrent Cornélis et coll. (1988b). On détecte également d'importantes quantités de capsides dans le noyau.

Toutefois cette sensibilité ne peut être corrélée avec une production efficace de particules virales infectieuses (infection abortive = non productive), cas de la cellule SCC 25 entre autres. Ainsi la mort cellulaire n'est pas seulement due à une action lytique directe des particules virales infectieuses néosynthétisées mais plus probablement à une activité cytotoxique des produits parvoviraux. La réplication de cet ADN parvoviral n'est efficace que dans des cellules non quiescentes et peu différenciées, notamment dans les cellules transformées (spontanément ou non) (Cornélis et coll. 1988a). Dans tous les cas, il apparaît une grande hétérogénéité dans la capacité des cellules à amplifier l'ADN parvoviral. Cette amplification est donc influencée par des facteurs cellulaires.

Les cas, déjà mentionné (cf. 2.3.3.), des NRK src ts est révélateur de facteurs cellulaires permettant l'établissement de fonctions cytotoxiques virales ou cellulaires. En effet, la sensibilité (mortalité) de ce système cellulaire aux parvovirus MVMp et la

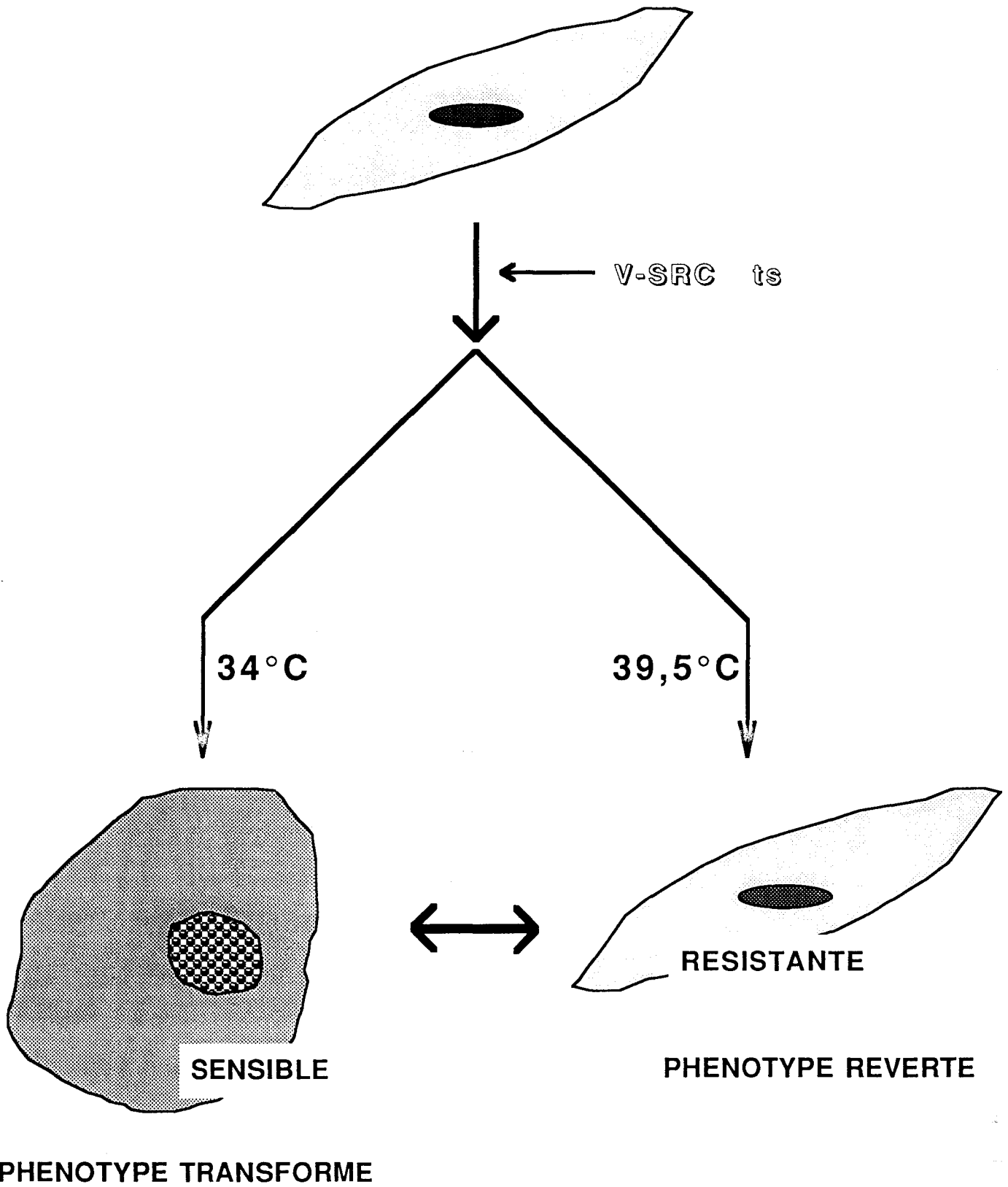


Figure 8. SYSTEME CELLULAIRE NRK-*src*-ts

capacité d'amplifier l'ADN viral sont dépendantes de l'expression d'une oncoprotéine thermosensible, le phénotype transformé est seul sensible et peut amplifier 3 fois plus l'ADN parvoviral que le phénotype réverté (Fig. 8). Or les 2 phénotypes peuvent produire efficacement les virus infectieux.

Ainsi un ou plusieurs événements liés à la transformation cellulaire maligne induiraient l'acquisition de la capacité pour une cellule à amplifier l'ADN parvoviral (Avalosse et coll. 1987) et permettre l'établissement d'activités cytotoxiques de la part des produits parvoviraux sans aucune corrélation avec une production de particules infectieuses. Cette transformation maligne inhiberait les facteurs bloquant ou induirait, voir augmenterait, la synthèse de facteurs cellulaires nécessaires, déjà existant dans les cellules souches de l'érythropoïèse et les cellules embryonnaires qui (peu différenciées et actives mitotiquement) manifestent une sensibilité aux parvovirus à un stade précoce de leur développement (Tableau 4 page 26).

2.5. RÔLE DES PROTEINES NON-STRUCTURALES

L'infection de cellules permissives par des capsides vides de parvovirus autonomes n'engendre aucun effet cytopathique (cf. 9.3.). La transfection de constructions parvovirales n'exprimant pas les protéines parvovirales NS-1 et NS-2 n'entraîne aucun désordre sur le plan cellulaire. Par contre les protéines non-structurales NS-1 et NS-2 s'avèrent être le siège d'activités cytotoxiques encore méconnues et agissant probablement en synergie. Il n'est pas surprenant, vu la faible complexité génomique du virus, que ces protéines possèdent plusieurs fonctions dont la synergie entraîne un effet cytopathique important.

2.5.1. RÔLE DE LA PROTEINE NON-STRUCTURALE NS-1

2.5.1.1. AMPLIFICATION DE L'ADN

Cette protéine (de 83 kD chez MVMp) localisée dans le noyau, est synthétisée très tôt lors du cycle parvoviral et participe activement à la réplication de l'ADN viral. Ainsi l'activité endonucléasique lors de la réplication du palindrome 5' (extension du RF1) serait directement ou non en corrélation avec la présence de la protéine NS-1 liée de façon covalente au monomère RF1 étendu (Cotmore et coll. 1988 - 1992) (Fig. 5 page 24).

L'activité topoisomérasique pressentie lors de la résolution de la forme RF2 serait réalisée également par cette protéine. Les monomères RF1 résultant de ce clivage du dimère RF2 ont des hairpins étendus liés de façon covalente à la protéine NS-1. Une partie de ces RF1 engendrent une descendance de génomes parvoviraux simple brin encapsidable et eux-mêmes liés à la protéine NS-1. Cette dernière est retrouvée sur la face externe de la particule virale infectieuse (Cotmore et coll. 1989).

2.5.1.2. REGULATION DE LA TRANSCRIPTION

Son caractère cytotoxique pourrait être dû en partie à ses activités de régulation de l'expression de certains promoteurs. Ainsi Rhode (1987) démontra que la protéine NS-1 réprimait *in vitro* l'activité de promoteurs viraux tels: promoteur de Harvey ras, LTR du Rous Sarcoma Virus (RSV), LTR du HIV-1 (Human deficiency virus 1) et son

propre promoteur P4. Par contre le promoteur P38 du H-1 est trans-activé (1000 fois) par cette protéine (Doerig et coll. 1988 - 1990). Cette activation, pour le virus H-1, se ferait par l'intermédiaire d'une séquence tar (trans-activation-responsive element) (Rhode 1987 - Gu et coll. 1992). Ces mêmes auteurs (Gu et Rhode 1992) démontrent l'existence d'une protéine de 75 kD affichant une affinité importante pour cette région. Etant donné que ce complexe n'est pas précipitable par des anticorps anti NS-1, il apparaît que la trans-activation du P38 passe par des interactions protéine-protéine dans lesquelles la protéine NS-1 est intimement impliquée, la modification apportée à la "tar-binding protein" (de 75 kD) permet l'activation du promoteur P38. Dans le cas du parvovirus MVMp, Ahn et coll. (1992) montrèrent que le tar élément n'était pas requis pour la trans-activation du promoteur P38 et que seules les séquences des motifs "GC box" et "TATA box" étaient nécessaires et suffisantes. A cet égard, les auteurs démontraient que la protéine NS-1 agissait probablement indirectement sur le P38 en modifiant l'activité du complexe de transcription Sp1 et TFIID qui interagit avec ces motifs.

Il apparaît donc que tous ces auteurs convergent à l'heure actuelle vers un processus indirect (commun) de trans-activation dans lequel les facteurs cellulaires impliqués en cours de détermination (complexe de transcription ?) interagiraient avec des motifs de la séquence parvovirale après que leur activité soit modifiée par la protéine NS-1.

2.5.2. RÔLE DE LA PROTEINE NS-2

Il existe trois isoformes de la protéine NS-2 de MVMp (25 kD environ): majeure, mineure et rare (et 2 isoformes, également réparties, pour le virus H-1). Ces isoformes

sont le résultat d'un épissage alternatif au niveau du petit épissage obligatoire, respectivement aux nucléotides: 2280-2377, 2317-2399 et 2280-2399 (Morgan et coll. 1986). Leur distribution au sein de la cellule est fonction de l'état de phosphorylation (Cotmore et coll. 1990), ainsi seules les isoformes majeures et mineures sont phosphorylées (Clemens et coll. 1990) et localisées dans le cytoplasme. Cette localisation cytoplasmique est en relation avec le rôle indispensable de la protéine NS-2 dans les processus de traduction des ARNm parvoviraux. En effet l'absence de cette protéine entraîne une diminution de 90 % des taux intracellulaires des protéines parvovirales sans pour autant perturber la transcription du génome viral (Li et coll. 1991). Par ailleurs, le cycle de réplication de cet ADN est très atténué pour les virus NS-2 déficients (Naeger et coll. 1990 - Li et coll. 1991) où la forme simple brin neosynthétisée est difficilement détectée. Ces deux observations expliquent ensemble la forte diminution de la production de particules virales infectieuses par une cellule permissive infectée par un virus déficient pour la synthèse de NS-2.

Il est à noter que le besoin de NS-2 au bon déroulement du cycle parvoviral serait pour des raisons encore inconnues spécifique de la cellule infectée (Naeger et coll. 1990 - Li et coll. 1991 - Cater et coll. 1992), ainsi NS-2 de MVMp est indispensable pour les cellules murines et NS-2 de H-1 pour les cellules de hamster. Dans les autres types étudiés (homme, singe, rat) l'absence de NS-2 n'entraîne pas de désordres significatifs dans le cycle de réplication de l'ADN parvoviral.

2.5.3. CYTOTOXICITE DES PROTEINES NS-1 ET NS-2

Le cas typique de la cellule de rat 208F (Cornélis et coll. 1988b) permet de mettre en évidence la cytotoxicité des protéines non-structurales. En effet cette cellule

résistante amplifie l'ADN parvoviral aussi efficacement que sa descendante At1a transformée par AEV (Avian Erythroblastosis Virus). Toutefois chez cette dernière, on note une augmentation de 2.5 des taux intracellulaires des ARNm viraux et des protéines non-structurales due à une activation importante du promoteur P4. La sensibilité étant nettement accrue, ces résultats confirment la cytotoxicité pressentie au niveau de ces protéines. Il faut noter que la cellule résistante 208F produit déjà des protéines non-structurales lors d'une infection par MVMp, il en ressort donc qu'un taux intracellulaire devrait être dépassé pour obtenir un effet cytocide de la part de ces protéines.

D'autre part, tous les travaux permettant d'isoler l'expression de la protéine NS-1 (Brandenburger et coll. 1990 - Li et coll. 1991 - Legendre et coll. 1992) démontrent que cette protéine exerce une cytotoxicité à l'égard de la cellule infectée. cette cytotoxicité siègerait dans les régions amine et carboxyl terminale de sa séquence (Legendre et coll. 1992), chacune d'entre elles exerçant une toxicité modérée dont l'expression conjointe est comparable au virus sauvage. Sachant que la protéine NS-2 régule la traduction des ARNm viraux, son absence induit une baisse de la cytotoxicité générale du parvovirus (Li et coll. 1991), elle contribue donc indirectement au pouvoir cytocide du parvovirus.

Clemens et coll. (1990) synthétisèrent des cDNA à l'aide d'ARNm parvoviraux R2 codant pour la protéine NS-2. Ces cDNA, contrôlés par le promoteur inductible du virus MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus), entraînent une production conditionnelle de la protéine NS-2. Cette production, bien qu'instable, entraîne une baisse de la viabilité cellulaire accompagnée d'une diminution importante de l'efficacité d'étalement cellulaire (plating efficiency). Ces résultats indiquent que la protéine NS-2 exercerait des activités cytotoxiques probablement exacerbées par une

synergie avec la protéine NS-1. Mais étant donné que sous les mêmes conditions expérimentales la protéine de capsid VP-1 induit le même résultat, il est encore trop tôt de conclure que cette protéine soit elle-même cytotoxique.

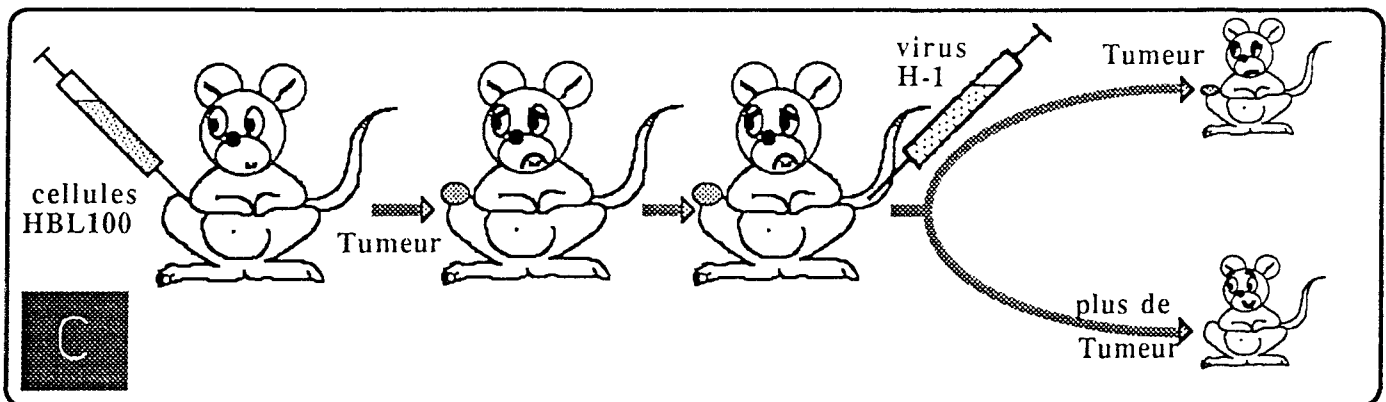
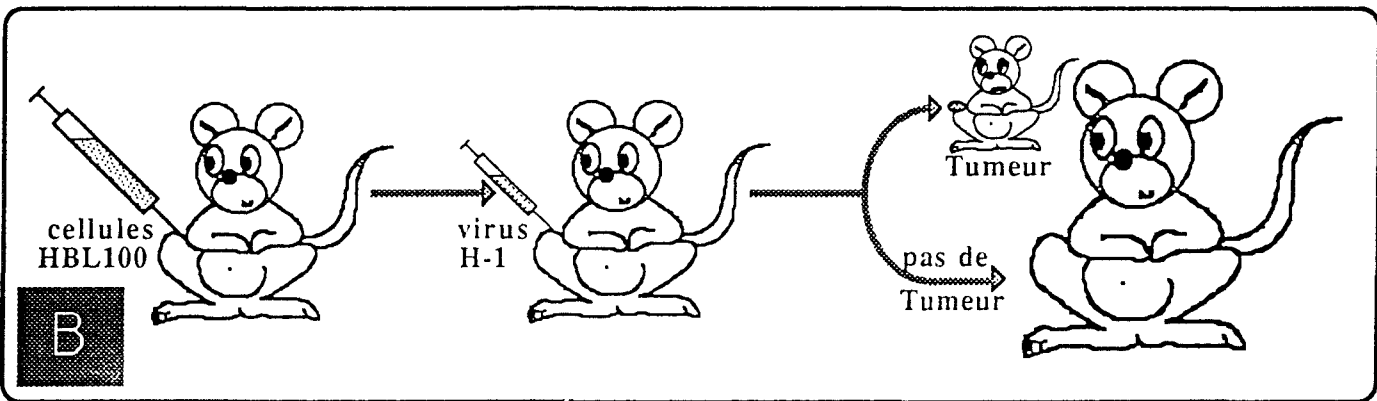
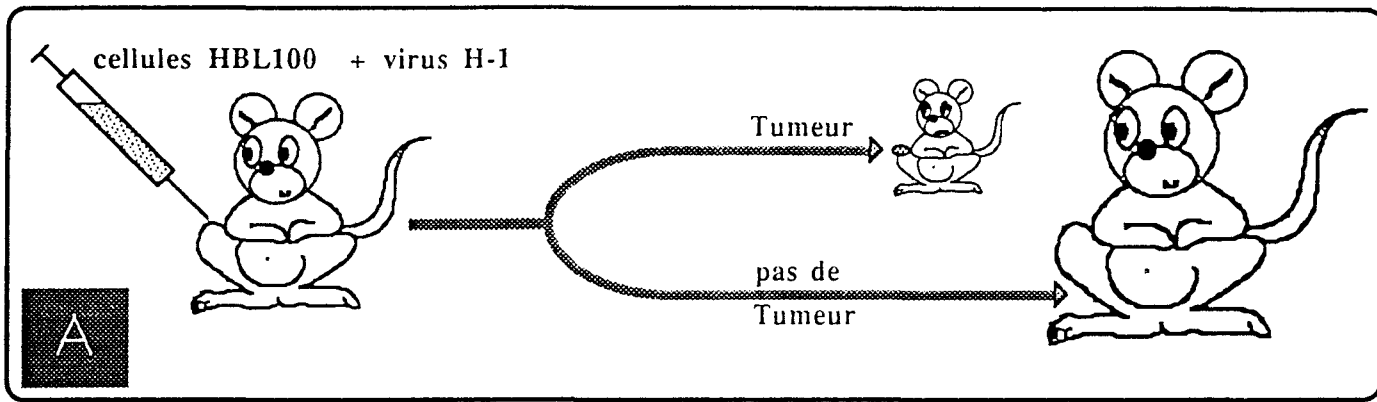


Figure 9: Activité anti tumorigénique du parvovirus H-1 *in vivo*
 (d'après Dupressoir et coll. 1989)

3. ONCOSUPPRESSION EXERCÉE PAR LES PARVOVIRUS

(Rommelaere et Tattersall 1988 - Rommelaere 1990 pour revues)

La diminution de l'apparition spontanée de tumeurs, observée par Toolan en 1967, chez des hamsters ayant survécu à une infection parvovirale néonatale, est étendue à d'autres types de tumeurs soit induites expérimentalement chez des rongeurs par des agents chimiques ou viraux, soit conséquentes à une greffe de cellules tumorigènes (Tableau 3 page 16).

Dans ce dernier cas, il fût montré dans notre laboratoire que le parvovirus H-1 exerce une activité antitumorale préventive (Fig. 9A) et, dans une moindre mesure, curative contre le développement de cellules épithéliales mammaires humaines implantées sur des souris nude, ceci sans effet secondaire décelable (Duppressoir et coll. 1989). En effet, une seule injection intraveineuse de H-1 chez une souris nude, ayant subit 36 jours auparavant une implantation de cellules tumorales humaines, conduit à une réduction de croissance des tumeurs voir une disparition totale sans résurgence ultérieure 6 mois durant (Fig. 9C). Si l'injection de parvovirus est réalisée au site de formation de la tumeur, l'inhibition de croissance est supérieure à 80 % (Fig. 9B). Cette protection, induite par les parvovirus, s'effectuerait pour une part de façon directe avec au moins une fraction des cellules transformées, des empreintes parvovirales ont été décelées dans des tumeurs en régression (Duppressoir et coll. 1989).

Dans le cas de tumeurs induites chimiquement, Toolan et coll. (1982) montrèrent que le parvovirus H-1 exerce une protection vis-à-vis de la tumorigénèse induite par le DMBA (Diméthyl benzanthracène), 38 % des animaux traités par ce produit

développent des tumeurs en cas de pré-infection par le parvovirus, contre 95 % sans pré-traitement viral (Tableau 3 page 16).

L'oncosuppression, exercée par les parvovirus s'effectuerait par l'entremise des protéines non-structurales ainsi que des séquences terminales non codantes de l'ADN viral. En effet, ces séquences contiennent des signaux d'initiation de la réplication et de la transcription qui participeraient à l'inhibition d'une réponse fréquemment associée à la transformation maligne, à savoir l'amplification de l'ADN. Ces terminaisons interféreraient avec des facteurs cellulaires d'amplification de l'ADN ce qui empêcherait ainsi l'induction de ce processus par les agents cancérigènes. Les protéines non-structurales exerceraient une action cytocide à l'égard des cellules néoplasiques. Ces protéines, nous l'avons vu, sont en effet capable d'interférer avec les processus d'amplification de l'ADN et l'activité de promoteurs exogènes telles les séquences promotrices des LTR de certains rétrovirus (Rous Sarcoma Virus par exemple) (Rhode et coll. 1987).

Ces données ou hypothèses in vivo s'appuient sur des résultats obtenus in vitro. Dans ce cas les parvovirus inhibent directement l'induction et/ou le maintien d'un phénotype transformé. Le fait qu'il y ait un lien direct entre l'accroissement dramatique de la sensibilité aux parvovirus et la transformation maligne, parfaitement illustré par un système cellulaire (NRK src ts) transformé de façon conditionnelle par une oncoprotéine thermosensible (Salomé et coll. 1989), indique que cette oncolyse sélective laisse entrevoir l'utilisation possible de ces virus pour la mise en évidence de changements cellulaires associés à la transformation néoplasique.

Toutefois le mécanisme par lequel la transformation exacerbe l'action lytique des parvovirus n'est pas entièrement élucidé. Ce phénomène ne résulte pas de la stimulation de la pénétration des virions inoculés et ne requiert pas, nous l'avions vu, la production de nouvelles particules (Tableau 2 page 15), par contre ces cellules se distinguent par leur aptitude à répliquer et exprimer le génome parvoviral (Tableau 2). Cette permissivité accrue des cellules transformées a pour effet d'enrichir ces cellules en protéines virales non-structurales dont la toxicité contribue vraisemblablement au processus d'oncolyse sans exclure que la transformation cellulaire puisse également modifier l'action des facteurs parvoviraux cytotoxiques.

L'Homme peut être infecté par divers parvovirus (H-1, B19) subissant par voie de conséquence une séroconversion dont le maintien suggère l'établissement d'un état porteur persistant du virus. En principe, une surveillance anticancéreuse pourrait s'exercer par suite de la réactivation du pouvoir antinéoplasique des parvovirus lors de l'apparition de clones de cellules transformées. Certaines données épidémiologiques sont compatibles avec cette possibilité (Mayor et coll. 1976). Toutefois, il est clair que des tumeurs peuvent apparaître en dépit de la présence de parvovirus. Ainsi des infections persistantes par le parvovirus B19 ont été décrites chez des patients souffrant de leucémie. Une cause possible de cet échappement résiderait dans l'incompatibilité entre certaines tumeurs et le tropisme cellulaire du virus (Guetta et coll. 1986). Enfin, bien que la tumeur puisse offrir un terrain favorable à la réplication parvovirale, l'activité antinéoplasique peut être limitée par la quantité de virus initialement présente, ceci expliquerait que des parvovirus furent initialement isolés à partir de tumeurs (Ostrove et coll. 1981 - Katz et Carter 1986).

Les mécanismes possibles de cette oncosuppression sont encore méconnus, toutefois le système immunitaire, saturé lors de la croissance tumorale, peut bénéficier de l'action inhibitrice des parvovirus sur cette croissance et promulguer ainsi à l'élimination des tumeurs sensibles aux parvovirus par un processus classique d'invasion lymphocytaire déjà décrit par Toolan et coll. (1982).

4. CONCLUSION ET PROJET

Il ressort donc que l'oncosuppression parvovirale reflète probablement de la régulation de la réplication virale en fonction de la prolifération et de la différenciation cellulaires. Ainsi avant de prévoir l'utilisation des parvovirus pour une thérapeutique anticancéreuse chez l'Homme, il est nécessaire de mieux comprendre le mode d'action cytotoxique de ces virus ce à quoi nous nous attachons ici. Le travail entrepris par le groupe de Jean Rommelaere devrait permettre d'exploiter l'oncotropisme des parvovirus pour produire des facteurs cytotoxiques parvoviraux ou hétérologues dans des tumeurs humaines. C'est dans cette optique que les travaux exposés ci-après furent exécutés.

Trois thématiques furent abordées.

- Nous savions en 1985, que les fibroblastes humains transformés par le virus SV40 manifestaient une hypersensibilité aux parvovirus H-1 et MVMP à l'opposé de la souche normale dont ils dérivent. Nous nous proposons donc de déterminer si cette nouvelle acquisition était ou non directement reliée spécifiquement à la transformation cellulaire par le SV40 en étudiant le cycle parvoviral (sensibilité, réplication de l'ADN, production virale) au sein de fibroblastes humains transformés par des agents chimiques et physiques.

- En 1988, nous savions donc, entre autres choses, qu'il existait une corrélation entre la transformation cellulaire maligne (quelque soit l'agent causal) et la sensibilité à l'effet cytopathique du parvovirus. Notre ambition à cette époque était de tirer profit de différences qualitatives d'expression génomique entre cellules normales (parentales) et cellules transformées afin d'établir une corrélation entre le taux d'expression de

certains gènes dans la cellule permissive et son degré de sensibilité au parvovirus. Dans ce cas, l'interaction entre ce ou ces gènes cellulaires et les parvovirus devrait ouvrir un nouveau champ d'investigation dans la lutte contre le cancer. En effet, outre le rôle de marqueur de la transformation cellulaire maligne, ces gènes pourraient constituer une cible préférentielle dans des processus cytotoxiques visant à éliminer d'un organisme les cellules malades en limitant les effets secondaires.

- La cytotoxicité des parvovirus paraît être en relation avec les protéines non-structurales du parvovirus. En effet le taux d'expression du gène NS-1/NS-2 ainsi que la concentration intracellulaire de ces protéines sont nettement plus élevés dans les cellules transformées que dans les cellules normales (Cornélis et coll. 1988b). C'est pourquoi, il nous apparut indispensable de connaître plus avant l'incidence de ces protéines sur le métabolisme cellulaire. Cette dernière thématique de notre travail, consiste à mettre en évidence, sans équivoque, la cytotoxicité très probablement exercée par ces protéines. A cet effet, nous avons dissocié le gène NS-1/NS-2 du contexte parvoviral puis nous l'avons introduit à l'aide de virus recombinés (vecteur rétroviral) dans différents systèmes cellulaires. La construction d'un tel outil de travail devrait nous apporter de précieux renseignements sur la compréhension des processus d'oncosuppression exercés par les parvovirus.

METHODES

5. METHODES

5.1. PRODUCTION ET PURIFICATION DE PARVOVIRUS

Les cellules indicatrices A9, cultivées en suspension (Spinner) dans du milieu Joklik 5 % SVF c'est à dire sans calcium, et les cellules NBE, cultivées sur support en "roller bottle" dans du milieu classique MEM 5 % SVF, sont utilisées pour produire respectivement de grandes quantités de virus MVMp et H-1. Dans cette étude nous avons produit du virus radiomarké au ^{32}P (Tattersall et coll. 1976a - Rhode 1978 - Rommelaere et coll. 1982) pour suivre le déroulement du cycle de réplication de l'ADN parvoviral. Afin d'obtenir un virus infectieux à forte radioactivité spécifique, il est nécessaire de limiter au maximum les effets de la radiolyse du ^{32}P (période 14.3 jours) donc de raccourcir le temps de production virale, c'est pourquoi les cellules sont infectées à forte M.O.I. (M.O.I. 10 au lieu de $5 \cdot 10^{-3}$) et incubées dans un milieu très riche en orthophosphate ^{32}P (50 $\mu\text{Ci/ml}$ à 100 $\mu\text{Ci/ml}$). Dans le cas d'une production de virus tritié, on ajoute de la (methyl- ^3H)thymidine (25 $\mu\text{Ci/ml}$ final).

8 heures après infection, le milieu de culture est remplacé par un milieu sans phosphate tamponné à l'Hepes auquel est ajouté l'orthophosphate ^{32}P . Une même quantité d'orthophosphate radiomarké est ajoutée 18 heures après infection (100 $\mu\text{Ci/ml}$ final). Dès que la lyse des cellules est généralisée, le virus est collecté suite à son hémagglutination avec des globules de sang de cobaye (0.2 % final). Les cellules sanguines sont ensuite lysées lors de cycles de congélation-décongélation et les débris cellulaires sont éliminés après centrifugation (17 000 g). Le surnageant (virus) est débarrassé de l'ADN cellulaire contaminant par l'action de la micrococcus nuclease (20 $\mu\text{g/ml}$) en présence de CaCl_2 (5 mM) 30 mn à 37°C . Le virus est ensuite purifié après une ultracentrifugation isopycniqne en CsCl_2 ($d=1.4 \text{ g/ml}$) à 260 000 g pendant 20 heures à $+4^\circ\text{C}$, le gradient est recouvert d'une couche de saccharose 1 M faisant

obstacle aux membranes cellulaires résiduelles et protéines contaminantes. Le gradient est récupéré par fractions dont on mesure la radioactivité, le virus (pic de radioactivité) est ensuite rassemblé puis dialysé contre du Tris 10 mM pH8.7 / EDTA 1 mM.

5.2. TITRATION DE VIRUS PAR HEMAGGLUTINATION

Les capsides de parvovirus MVMp et H-1 hémagglutinent les globules rouges de sang de cobaye (Siegl 1976 - 1984). Sur une plaque de titration de 96 trous, il est possible de déterminer le nombre de particules virales contenues dans la suspension à tester sachant qu'une unité d'hémagglutination (HAU) correspond à $2 \cdot 10^5$ pfu MVM ou $8.75 \cdot 10^6$ pfu H-1. Pour ce faire chaque puits contient 25 μ l d'une dilution (connue) de la suspension virale (dilution par entraînement dans les deux directions) auxquels on ajoute 25 μ l d'une suspension de globules rouges de cobaye à 1 % (incubation 1 heure à +4°C). Le titre est obtenu en notant la dernière dilution à hémagglutiner les cellules sanguines.

5.3 TITRATION DE VIRUS EN "PLAQUE-ASSAY"

Le virus étant lytique, on compte le nombre de plages de lyses formées par le virus sur une monocouche de cellules indicatrices (A9 pour le virus MVMp ou NBE pour H-1). Les virus produits sont libérés après trois cycles de congélation-décongélation puis dilués dans du PBS⁻. Afin d'éviter la dispersion du virus neosynthétisé par les cellules indicatrices, celles-ci sont recouvertes, après infection, d'une couche d'agar à 0.75 % dans du milieu de culture 2 fois concentré (5 ml MEM 2X (37°C) + 3 ml Agar 1.7 % (48°C)). Dès que les plages apparaissent (5 jours après environ), les cellules sont colorées au rouge neutre dilué dans une fine couche d'agar à 0.5 %. Les plages de lyse (blanches) peuvent alors être comptées.

5.4. CLONOGENICITE DES CELLULES SUR SUPPORT PLASTIQUE

Un nombre précis de cellules (100, 200, 500) pré-infectées (M.O.I. 10) ou non sont ensemencées dans des boîtes de 100 mm de diamètre dans un petit volume (4 ml) de milieu de culture dont 1/3 est déjà conditionné afin de faciliter leur reprise. Une semaine plus tard le milieu est additionné de milieu neuf (4 ml).

Quand les clones cellulaires apparaissent, les cellules rincées au PBS⁻ sont fixées à froid par le mélange acide acétique/méthanol (1:3 vol/vol). Après un rinçage rapide à l'éthanol 70 %, les clones sont colorés avec du Giemsa 5 % pH6, séchés puis comptés (Mousset et coll. 1988).

5.5. SURVIE CELLULAIRE

La survie des cellules, suite à une infection par le parvovirus (M.O.I. 10), est déterminée quotidiennement en mesurant la proportion de cellules mortes. Toutes les cellules d'une boîte de culture (fixées sur le support ou flottant dans le milieu) sont précipitées par centrifugation légère. Les cellules mortes sont ensuite spécifiquement colorées par le bleu trypan (0.1%) et comptées dans une cellule de Thoma.

5.6. ADSORPTION DE VIRUS

Les cellules testées sont infectées 1 heure à 37°C par du virus marqué au tritium (2.10^3 cpm = A). L'inoculum (B) est récupéré et la radioactivité comptée. La solution de rinçage (C) (milieu de culture propre) est collectée et comptée. Une solution d'EDTA 1 mM (D) est utilisée pour décrocher les virions non adsorbés par la membrane cytoplasmique de la cellule, la radioactivité est comptée.

La proportion de virus adsorbé par la cellule est de $100 \% \times (1 - (B+C+D)/A)$.
(Chen et coll. 1986).

5.7. DISPERED CELL ASSAY

Cette technique (Winocour et coll. 1980) permet de déterminer s'il y a amplification de l'ADN viral entre 2 heures et 30 heures après infection par le virus à une M.O.I. de 10^{-1} .

L'inoculum est retiré après l'étape d'infection.

Les cellules sont, au temps voulu, filtrées sur des membranes de nitrocellulose BA 85 (Millipore) d'une porosité de $0.45 \mu\text{m}$. Ces dernières sont ensuite traitées successivement par NaOH 0.5 N (dénaturation, lyse cellulaire), Tris 0.9 M pH7 / SSC 2X (neutralisation) puis cuits 1 heure à 80°C . La quantité d'ADN viral est ensuite évaluée en comptant la radioactivité fixée sur la membrane après l'avoir hybridé avec une sonde radioactive. Le facteur d'amplification est le rapport du comptage à $T_1=30$ heures après infection par celui de $T_2=2$ heures après infection.

(SSC 1X: NaCl 150 mM / Citrate de Sodium 15 mM pH 7)

5.8. CONVERSION IN VITRO DU PARVOVIRUS MVMp

L'ADN simple brin du parvovirus (100 ng pour 10^8 pfu) est extrait au phénol/chloroforme. La conversion en double brin est effectuée par la DNA polymérase I Klenow (2 unités) en présence de MgCl_2 10 mM, dATP, dGTP, dTTP 90 μM chacun, et 1 μCi de dCTP- $\alpha^{32}\text{P}$. L'ADN est ensuite précipité puis utilisé comme marqueur de taille lors d'électrophorèse d'ADN parvoviraux.

5.9. EXTRACTION D'ADN EXTRA-CHROMOSOMIAL (B. HIRT)

Les cellules sont lysées dans une solution de SDS 0.6 %, Tris 10 mM pH7.5, EDTA 10 mM pendant 30 mn à 37°C puis en présence de Protéinase K (200 µg/ml) durant 1 heure à 37°C. L'ADN chromosomal est précipité la nuit à froid en ajoutant du NaCl jusqu'à atteindre une concentration de 1 M final et éliminé après une centrifugation d'une heure à 17 000 g. L'ADN viral (surnageant), précipité à l'alcool (15 000 g 1 heure à 0°C), est traité ensuite à la RNase A (20 µg/ml) (DNase free) 10 mn 37°C. Les protéines sont extraites au phénol/chloroforme et l'ADN précipité à l'alcool.

5.10. SOUTHERN BLOT

(Southern 1975)

Les échantillons d'ADN ont migré dans un gel d'agarose à 1 %. Afin de permettre le transfert de ces ADN sur une membrane de nitrocellulose, il est nécessaire de le dénaturer dans le gel (NaOH 0.5 M; NaCl 1.5 M : 2 X30 mn). Si cet ADN contient des fragments de grande taille (> 10 kbp) il faut préalablement "casser" la maille du gel dans de l'HCl 0.25 N pendant 30 mn. Le gel est enfin neutralisé (2 X 45 mn) dans une solution de Tris-HCl 0.5 M pH 6 / NaCl 3 M.

Le transfert s'effectue la nuit en réalisant le montage décrit dans le "Molecular cloning" (Maniatis et coll. 1989), le flux par capillarité de SSC 6X au travers du gel entraîne les acides nucléiques vers la membrane. Ceux-ci sont définitivement fixés après cuisson de la membrane 1 heure à 80 °C.

5.11. SONDE NUCLEIQUE RADIOACTIVE NICK-TRANSLATEE

La séquence d'ADN à marquer (un plasmide) est à la fois digérée par la DNase (20 ng/ml) qui pratique des trous (nick) et réparée par la polymérase de Kornberg (10 unités pour 100 µL de mélange réactionnel) qui polymérise de l'ADN en déplaçant le point de coupure (translation) (Rigby et coll. 1977). Cette réaction s'effectue à froid 14°C (30 mn) en présence de Tris 10 µM pH 7.5 / MgCl₂ 10 µM / 100 ng de DNA par membrane / dATP, dTTP et dGTP 25 µM chaque / 30 µCi dCTP-α³²P. La réaction stoppée (EDTA 20 mM), les nucléotides non incorporés sont éliminés en chromatographie d'exclusion dans une colonne de Sephadex G50 conditionnée avec du sperme de saumon dénaturé 1 mg/ml puis lavée (Tris 10 mM pH8 / EDTA 1 mM pH8). La sonde débarrassée des nucléotides non incorporés est récupérée après centrifugation de la colonne (1250 g).

5.12. HYBRIDATION D'UNE MEMBRANE DE NITROCELLULOSE

La membrane de nitrocellulose est préhybridée sous agitation périodique pendant 1 heure à 41°C dans 20 ml de tampon de saturation (SSC 3X (ou 7.5X si peu d'homologie de séquence); Denhart 1X (cf. Maniatis et coll.); Hepes 50 mM; DNA de sperme de saumon dénaturé à 125 mg/ml; Formamide 50 %). Ce même tampon est utilisé pour l'hybridation 10 heures au minimum avec la sonde radioactive (dénaturée 10 mn à 100°C). Le lavage s'effectue à chaud (50°C) dans SSC 0.1 % / SDS 0.1 % en cas d'homologie de séquence entre la sonde et sa cible sinon SSC 2X / SDS 0.1 %. La sonde est réutilisable.

5.13. EXTRACTION DES ARN TOTAUX

Les ARN totaux sont préparés à partir d'une culture cellulaire de 30 à 300 millions de cellules. Celles-ci sont lysées et broyées dans un tampon Guanidinium (Guanidine thiocyanate 4.7 M, Acétate de Sodium 0.02 M, Sarcosinate de sodium 0.5%, Tris-HCL 0.05 M, β -mercapto éthanol 0.1 M). Les ARN sont précipités lors d'une ultracentrifugation sur coussin de Césium (CsCl 5.7 M, Acétate de Sodium 0.25 M) 18 heures à 125 000 g à 18°C. Le culot est repris dans de l'eau traitée au DEPC (diéthyl pyrocarbonate), les ARN sont quantifiés au spectrophotomètre (1 unité de densité optique à 240 nm de longueur d'onde = 45 μ g d'ARN) ou après électrophorèse dans un minigel d'agarose à 1 %.

5.14. NORTHERN BLOT

Les ARN migrent dans un gel d'agarose-MOPS à 0.9 % (cf. Maniatis et coll. 1989). Avant le dépôt, 20 μ g d'ARN totaux (ou 1 μ g de poly A+) sont dénaturés 2 minutes à 95°C dans le tampon de dépôt. La migration s'effectue la nuit sous une tension de 20 volts dans le tampon MOPS.

Le transfert des ARN sur une membrane se réalise (sans préparation particulière du gel) avec le même dispositif utilisé pour le Southern blot mais la solution saline est SSC 20 fois concentrée.

5.15. PURIFICATION DES ARN POLY A+

La solution d'ARN totaux (Tris 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM pH 7.5, NaCl 0.5M, SDS 0.5 %) est passée (en circuit fermé pendant une heure) au travers d'une colonne oligodT qui fixera spécifiquement les ARN possédant une séquence nucléique poly-

adénylée (ARN messagers). Après élimination des ARN polyA-, les ARN polyA+ sont décrochés de la colonne par la solution suivante: Tris 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM pH7.5, DEPC 0.1 %. Cette chromatographie d'affinité est suivie en mesurant directement la densité optique à la sortie de la colonne.

Les ARNm sont ensuite précipités à l'éthanol et conservés à -70°C dans de l'eau traitée au DEPC.

5.16. CONSTRUCTION D'UNE cDNATHEQUE

Celle-ci est réalisée selon les instructions et produits contenus dans le kit commercialisé par la société Amersham. Le premier brin de cDNA synthétisé est radiomarqué par l'ajout de dCTP- $\alpha^{32}\text{P}$ (40 μCi) ce qui nous permet de suivre les cDNA tout au long de la construction. Pour permettre l'insertion (et l'extraction) aisée des cDNA (double brin) dans un phage ou un plasmide, on flanque celui-ci d'extrémités cohésives (linker) qui ne sont en fait que le site de reconnaissance (et de coupure) de l'enzyme de restriction EcoR I (GGAATTCC). Afin d'éviter des coupures internes de ce cDNA par EcoR I, les sites EcoR I internes sont protégés par l'action préalable de 40 Unités d'EcoR I méthylase (pour 75 μl de cDNA dans Tris 10 mM - EDTA 1 mM, pH8) en présence de S-adenosyl-Méthionine 0.6 mM (méthylation des adénine). Le linker EcoR I est ensuite incubé en excès molaire de 100 fois avec les cDNA et 4 unités de DNA ligase T4 par μg de cDNA.

les cDNA ainsi obtenus sont sélectionnés pour leur taille dans un gradient linéaire de sucrose 5 - 25 % centrifugé à 135 000 g, 18 heures à 20°C. Un aliquote de chaque fraction est déposé dans un gel d'agarose 1 %, après migration rapide, le gel est séché puis autoradiographié. Les fractions contenant des cDNA dont la taille excède 500 bp sont rassemblés, précipités à l'alcool. Ces cDNA sont insérés au site EcoR I du

phage λ 1149 lesquels sont empaquetés dans les capsides du bactériophage avec l'aide d'un kit commercialisé par la société Boehringer. Ces phages constituent la cDNATHèque.

5.17. HYBRIDATION LIQUIDE

La sonde cDNA simple brin est synthétisée avec le même kit Amersham, cette fois-ci 500 μ Ci de dCTP- α^{32} P sont ajoutées au mélange réactionnel. L'ARN matriciel est ensuite hydrolysé à la soude 0.6 N.

Après neutralisation, la sonde est précipitée dans l'alcool en présence de 1 mg d'ARN totaux de l'autre cellule. L'hybridation liquide s'effectue dans 100 μ L de tampon d'annealing (Tris-HCl 0.02 M, pH 7.5; EDTA 1 mM, pH 7.5; NaCl 0.3 M) 48 heures à 68°C.

5.18. CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE D'HYDROXYAPATITE

L'échantillon est déposé sur une colonne d'hydroxyapatite de 2 cm pré-équilibrée avec le tampon: Na_2HPO_4 10 mM / NaCl 1 M. Après un rapide lavage dans ce même tampon, les molécules d'acides nucléiques simple brin sont décrochées par 2 x 2.5 ml de Na_2HPO_4 0.14 M / NaCl 1 M, Les molécules double brin sont décrochées par 2 x 2.5 ml de Na_2HPO_4 0.4M. L'ARN contenu dans cette seconde espèce est hydrolysé par NaOH 0.6 N.

5.19. SELECTION DES CLONES cDNA

50 000 à 500 000 phages sont adsorbés sur 200 µl d'une suspension de bactéries Pop 136, 10 mn à 42°C. Les cellules infectées sont diluées dans 3 ml d'agar à 0.8 % et étalées dans des boîtes de 100 mm de diamètre précoulée avec de l'agar 1.2 %.

Dès que les plages sont visibles, on transfère sur une membrane de nitrocellulose (par simple contact) la culture. Il restera suffisamment de phages et bactéries sur l'agar pour faire un double de ce répliquat. Ces 2 répliques sont traitées comme toute membrane de nitrocellulose pour les hybrider avec une sonde radioactive.

Après superposition des autoradiographies obtenues et sélection des spots (phages) (cf. principe de l'hybridation différentielle de cDNAthèque 5.1.), les phages positifs sont réétalés (dilué au 1/1000^{ème}), resélectionnés puis amplifiés en grande quantité.

5.20. PREPARATION DE GROS STOCKS DE PHAGES

Une plage de phages sélectionnée est adsorbée sur 20 ml de bactéries PoP 136, 10 mn à 42°C puis diluée dans 250 ml de milieu de culture. Quand les bactéries sont lysées (4 à 6 heures après infection) celles-ci sont précipitées la nuit à 4°C par CHCl₃ 0.1 %/ PEG 25g/ NaCl 0.45 M. Après faible centrifugation (4 500 g), le culot repris dans 4.5 ml de Tris-HCl 10 mM pH7.5/MgSO₄ 10 mM/NaCl 10 mM est clarifié avec le chloroforme (1 volume) dans les même conditions de centrifugation.

Les phages (phase aqueuse additionnée de 3.5 g de CsCl) sont ensuite purifiés lors d'une ultracentrifugation 2 heures à 345 000 g à 18°C. L'ADN peut être extrait en faisant agir la protéinase K en présence de sarcosyl (digestion des protéines de capsid). Les peptides résiduels et l'enzyme sont éliminés lors d'une extraction au

phénol/chloroforme. L'ADN précipité à l'éthanol peut être conservé à long terme dans du Tris 10 mM / EDTA 1 mM.

5.21. TRANSFECTION DE CELLULES EUCARYOTES

$5 \cdot 10^5$ cellules sontensemencées la veille dans des boîtes de 60 mm de diamètre. Dès que les cultures présentent une confluence d'environ 70 %, les cellules sont conditionnées dans du milieu MEM HEPES additionné de 10 % Serum de veau foetal (Gibco BRL) (3 ml par boîte) en chambre chaude (3 heures à 37°C). L'ADN à transférer (Tris 1 mM; EDTA 0.1 mM; CaCl₂ 0.25 M) est ajouté stérilement goutte à goutte à un même volume de HBS 2X pH 7.12 sous agitation. Dès que le précipité apparaît, 1 ml de celui-ci est ajouté à chaque boîte. 3-4 heures après on replace les boîtes dans leur milieu normal de culture à 37 °C en atmosphère humide à 5 % de CO₂ (Graham et Erb 1973).

5.22. CAT ASSAY

Cette technique a pour but de mettre en évidence l'activité de certains promoteurs ou gènes. Ceci se caractérise par l'acétylation conditionnelle du chloramphénicol (marqué au ¹⁴C) par le produit du gène CAT (Chloramphénicol Acétyl Transférase), cette réaction est visualisée en autoradiographie.

Dans notre contexte, le gène CAT est sous le contrôle du deuxième promoteur parvoviral P38 (plasmide p38CAT). L'activité à tester est la trans-activation de ce promoteur par la protéine non-structurale NS-1 du parvovirus MVMp.

Une culture de cellules NBE (Human newborn kidney) est transfectée à la fois par 1 µg de plasmide p38CAT et 1 à 10 µg du plasmide à tester. 48 heures plus tard, les cellules sont lysées lors de 2 cycles de congélation-décongélation dans 150 µl de

Tris 0.25 M pH7.8. 50 µl de cet échantillon sont incubés 2 heures à 37°C avec 150 µl d'acétyl CoA (0.35 mg/ml) et 0.1 µCi de chloramphénicol-¹⁴C. Les produits de la réaction sont repris et concentrés dans 10 µl d'acétate d'éthyle froid puis déposés sur une plaque de silicagel pour subir une chromatographie en couche mince dans le solvant de migration méthanol/chloroforme (5:95). Les résultats sont visualisés en autoradiographie (cf. Fig. 15)

5.23. IMMUNOPRECIPITATION DE PROTEINES

Les protéines sont marquées métaboliquement avec de la L-³⁵S-méthionine pendant une heure. Les cellules rincées (Tampon TNE = Tris 10 mM, pH 7.4 ; NaCl 150 mM, EDTA 1 mM) sont ensuite lysées à froid dans la solution détergente RIPA (Tris-HCL 10 mM pH7.4; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM, Triton X100 1%; Sodium desoxycholate 0.5 %; SDS 0.1 %; Aprotinine 0.5 %). Après centrifugation (1 heure, 145 000 g), le culot cellulaire est aliquoté en fractions de 5.10⁶ cpm environ.

Les protéines considérées sont recherchées par les anticorps adéquats (1 à 10 µl) 1 heure à froid. Les anticorps (complexés ou non à un antigène) reconnus par la protéine A sépharose (30 mn) sont précipités lors d'une brève centrifugation en microfuge. Les complexes sont lavés successivement avec:

- 1) RIPA;
- 2) RIPA, NaCl 500 mM
- 3) RIPA; TNE
- 4) TNE puis conservés à -70°C.

Avant le dépôt en gel de polyacrylamide, ceux-ci sont dissociés à la chaleur (100°C 5mn) dans du tampon de charge (Tris 100 mM pH 6.5; SDS 5%; βmercapto-

éthanol 20 %; Bleu de Bromophénol), les particules de sépharose sont précipitées en microfuge.

Un même volume est déposé sur gel de polyacrylamide.

5.24. ELECTROPHORESE DE PROTEINES

L'électrophorèse des protéines s'effectue dans un gel de polyacrylamide vertical durant 18 heures sous une différence de potentiel de 60 volts constants dans le tampon de migration (Tris 25 mM / Glycine 20 mM / SDS 0.1 %). La composition du gel est la suivante:

GEL de SEPARATION (inférieur) en ml	10 %	15 %
Acrylamide-Bisacrylamide 30:0.4	8.8	12.9
Tris 1 M pH8.8	10	10
H ₂ O	7.45	3.4
SDS 10 %	0.26	0.26
Persulfate d'ammonium 10 %	0.135	0.135
TEMED (N,N,N',N', Tetramethyl-ethylenediamine)	0.027	0.027

Dans notre contexte, la protéine NS-1 (83 kD) est visualisée dans un gel à 10 %, la protéine NS-2 (25 kD) dans un gel plus concentré à 15 %..

GEL de CONCENTRATION (supérieur) en ml

Acrylamide-Bisacrylamide 30:0.8	1.5
Tris 0.5 M pH6.8	1.25
H ₂ O	7.1
SDS 10 %	0.1
Persulfate d'ammonium 10 %	0.1
TEMED	0.01

Les protéines étant radiomarquées, le gel sera séché 1 heure à 80 °C sur du papier Whatman 3MM avant autoradiographie. Au préalable le gel est traité successivement dans 1) Eau, Méthanol, Acide acétique glacial (5/5/1 vol) 1 heure,
2) Diméthylsulfoxyde (DMSO) 1 heure,
3) DMSO, PPO (2,5-Diphenylloxazol) 22 % (poids/volume) 3 heures
4) Eau 1 heure.

5.25. WESTERN BLOT

Les protéines (non marquées) ont migré dans un gel de polyacrylamide. La quantité de protéines déposée correspond à 1.10^6 cellules lysées avec le RIPA. Après démoulage du gel, ce dernier est plaqué (sans bulle d'air) contre une membrane "Immobilon" (Millipore) dans un sandwich de papier Whatman et tampon jex (décrit dans Maniatis et coll. 1989) prémouillés dans le tampon de transfert (Tris 20 mM, Glycine 150 mM, Méthanol 20 %). Les protéines sont transférées (4 heures) sur la membrane sous l'impulsion d'un courant de 300 mA constants. Les sites non-spécifiques de fixation de protéines sur la membrane sont bloqués lors d'une incubation de 4 heures dans le tampon de blocage (PBS⁻, 5 % lait). Les protéines sont ensuite recherchées la nuit par les anticorps adéquats dilués au 1/100 (minimum) dans 10 ml de tampon de blocage. Après le lavage (tampon de blocage avec NP40 0.1%), les anticorps sont complexés à la protéine A radio marquée à l'iode (environ 10^5 cpm par membrane de 100 cm^2). La membrane lavée (TNE 0.1 % NP40 / RIPA / TNE 0.1 % NP40) est ensuite autoradiographiée.

LA TRANSFORMATION MALIGNNE
SENSIBILISE LES CELLULES
A L'INFECTION PARVOVIRALE

6. SENSIBILITE AUX PARVOVIRUS ET TRANSFORMATION MALIGNE

Les résultats exposés ci-dessous ont fait l'objet d'un article paru dans *Journal of virology* en 1988, volume 62, pages 1679-1686 (voir Annexe page 110):

"Cornélis J.J., Becquart P., Duponchel N., Salomé N., Avalosse B., Namba N. and Rommelaere J.. Transformation of human fibroblasts by ionising radiation, a chemical carcinogen, or simian virus 40 correlates with an increase in susceptibility to the autonomous parvoviruses H-1 virus and minute virus of mice."

6.1. INTRODUCTION

A cette époque, les cellules humaines normales (nombre de passage fini) étaient connues comme résistantes aux parvovirus de rongeur H-1 et MVMP et incapables de produire de nouvelles particules parvovirales infectieuses (Cotmore et coll. 1987). La transformation maligne par le virus SV40 de fibroblastes de peau humaine rendait ces cellules plus permissives et sensibles au parvovirus H-1 que leur parents non transformés (Chen et coll. 1986). SV40 est un virus transformant très puissant capable d'activer des gènes cellulaires (Schutzbank et coll. 1982) mais incapable d'apporter directement les fonctions nécessaires à la réplication du parvovirus (Mousset et coll. 1988). Le but de ce projet fut de déterminer si l'hypersensibilité aux parvovirus observée pour les fibroblastes humains transformés était spécifique des cellules transformées par le SV40 ou était aussi relatée à d'autres agents transformants (chimique ou physique).

Cellules	Origine	Agent transformant	Survie ^a	Adsorption ^b	Amplification ^c	
					DCA	Production
KMS-6	Embryon total		75	33	16	0.3
KMST-6	Embryon total	Rayons γ	7	38	1 330	0.2
WI38	Poumon		90	18	14	0.25
WI38CT-1	Poumon	Rayons γ	20	37	190	14.5
SUSM-1	Foie	4-NQO ^d	22	38	335	305
MRC-5	Poumon		68	44	28	0.5
MRC-5V1	Poumon	SV40	2	50	1 85.	20
NB-E	Rein	SV40	1	35	2 160	550

Tableau 5 : Susceptibilité des fibroblastes humains embryonnaires au parvovirus H-1
(Cornélis et coll. 1988a). (moins de 25% de déviation standard sur 2 à 3 essais).

^a : Pourcentage de cellules vivantes mesuré 5 jours après infection (M.O.I. 10)

^b : Pourcentage de virus adsorbé par la membrane plasmique (résistant à l'éluéon à l'EDTA)

^c : Rapport de la quantité d'ADN viral par culture à 30 heures par rapport à 2 heures après infection (M.O.I. 10^{-1}), déterminée par la technique du dispersed cell assay; et rapport de la quantité de virus infectieux à 120 heures par rapport à 2 heures après infection (M.O.I. 10^{-1}).

^d : 4-Nitroquinoline 1-oxyde

Cellules	Survie	Adsorption	Amplification	
			DCA	Production
KMS-6	90	46	15	0.1
KMST-6	40	40	340	2.5
WI38	91	24	1	0.3
WI38CT-1	75	37	10	2.0
SUSM-1	77	39	25	14.5
MRC-5	85	45	2	0.15
MRC-5V1	53	43	20	18.5
A9	40	38	1 750	10^4

Tableau 6 : Caractéristiques de l'infection par MVMp de fibroblastes humains
(Cornélis et al. 1988a).

(conditions expérimentales et définitions sont les mêmes que pour le tableau 5)

Enfin la transformation de fibroblastes humains par le virus SV40 avait pour conséquence de convertir une infection initialement abortive en une infection productrice de nouvelles particules parvovirales infectieuses. De ce fait il était important de déterminer si la transformation de ces cellules par d'autres agents transformants fournissait aussi à la cellule la capacité de produire une nouvelle génération de parvovirus infectieux. Si tel n'était pas le cas, cela confinerait les événements causant la mort cellulaire en un moment particulier du cycle parvoviral.

6.2. LIGNEES CELLULAIRES

Les fibroblastes de poumon embryonnaire humain (nombre limité de passages) MRC-5, WI38 ou d'embryon total KMS-6 sont transformés par le virus SV40 (MRC-5V1) ou par les rayons γ (WI38CT-1 et KMST-6). Les fibroblastes de foie embryonnaire humain SUSM-1 sont transformés par la 4-nitroquinoline 1-oxyde.

6.3. RESULTATS

6.3.1. SENSIBILITE AUX PARVOVIRUS

L'effet cytocide des parvovirus H-1 et MVMp est apprécié en mesurant la proportion de cellules mortes 5 jours après infection (colonne "survie" du Tableaux 5 et 6). Ces résultats montrent une réduction de la fraction de cellules vivantes après

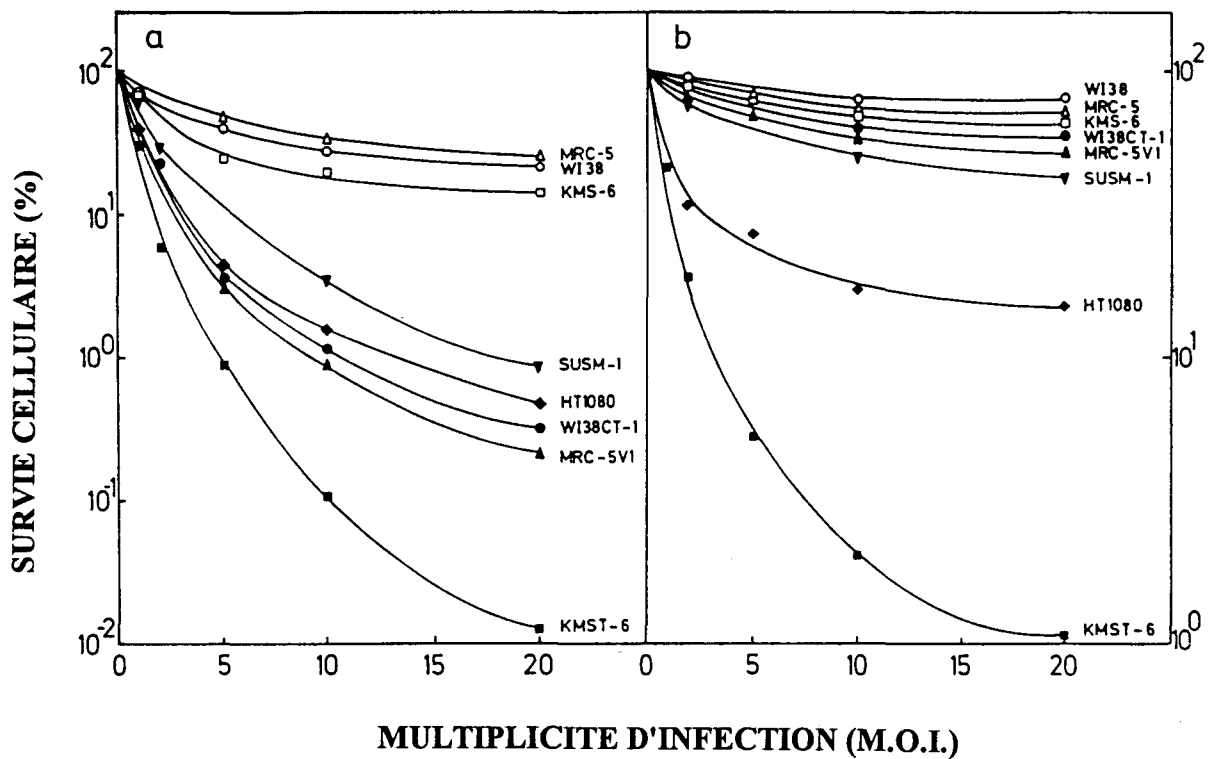


Figure 10: Sensibilité des fibroblastes humains au parvovirus H-1 (a) ou MVMp (b).
 Les cellules ont été infectées à M.O.I. croissantes. La survie cellulaire a été mesurée par leur aptitude à former des colonies survivantes. Symboles ouverts : cellules normales. Symboles fermés: cellules transformées. La cellule HT 1080 est issu d'un fibrosarcome humain.

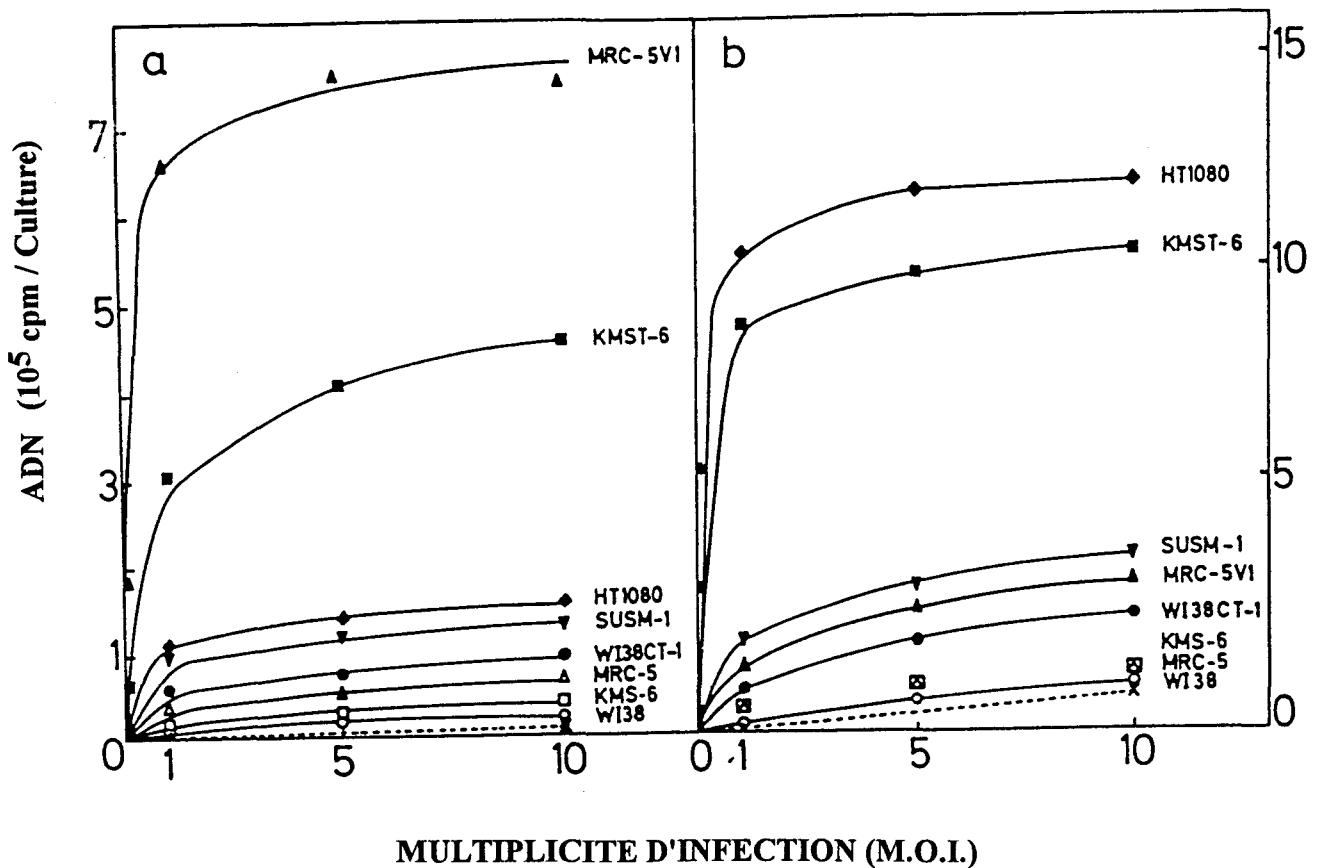


Figure 11: Accumulation de l'ADN viral de H-1 (a) ou MVMp (b) dans des fibroblastes humains infectés.

Les cellules ont été infectées à M.O.I. croissantes. Leur contenu en ADN viral a été déterminé par la technique du dispersed cell assay 30 heures après infection. La quantité d'ADN initiale mesurée 2 heures après infection, était similaire pour toutes les cellules. Celle-ci est représentée par une ligne pointillée pour comparaison.

l'infection par H-1 ou MVMp. Celle-ci est nettement plus importante dans le cas des cellules transformées. L'impact viral sur ces cellules est toutefois mieux défini en mesurant la capacité des cellules infectées à former des clones cellulaires (clonogénicité sur support plastique). Les résultats (Fig. 10) démontrent ainsi clairement que les cellules transformées sont plus sensibles à la cytotoxicité des parvovirus, à M.O.I. 10 ces cellules sont 20 à 200 fois plus sensibles au parvovirus H-1 que leur parente normale. MVMp réduit également, dans une moindre mesure, l'efficacité de clonage de ces cellules.

6.3.2. INTERNALISATION DES VIRUS

Les mesures d'adsorption des parvovirus par la membrane cytoplasmique ne montrent pas de différences significatives entre les diverses cellules (normales ou transformées) permettant d'expliquer la plus grande sensibilité des cellules transformées aux parvovirus (Tableaux 5 et 6 page 57). Globalement il n'existe pas de relation entre la quantité de virus internalisé et le degré de sensibilité au virus.

6.3.3. REPLICATION DE L'ADN PARVOVIRAL

Lorsque nous évaluons la synthèse d'ADN parvoviral total, 2 heures et 30 heures après infection, selon la technique du "dispersed cell assay", il apparaît que la quantité d'ADN (similaire pour toutes les cellules à 2 heures) augmente au cours du temps avec la M.O.I. jusqu'à un plateau (Fig. 11). Bien qu'il y ait de grandes variations entre les

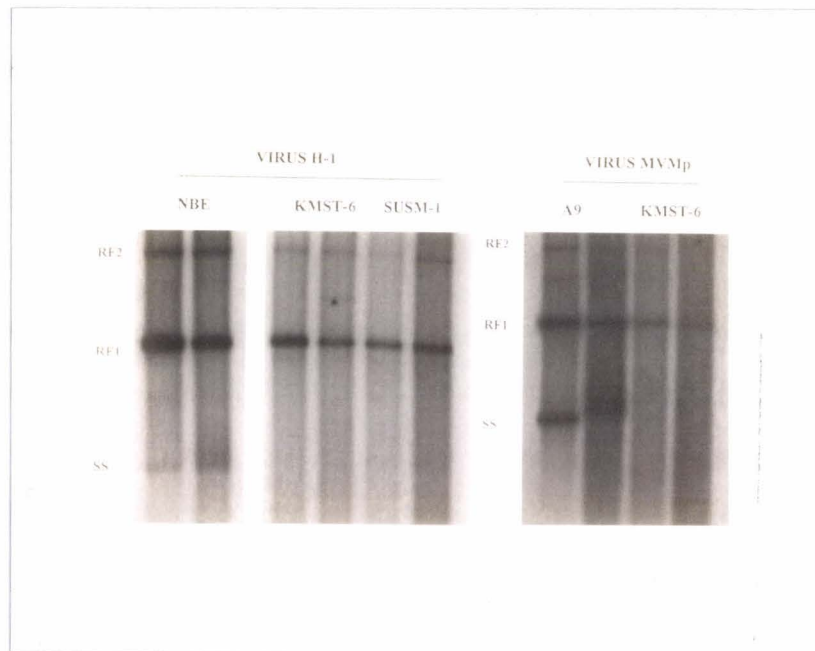


Figure 12: Synthèse de l'ADN de MVMp et H-1 dans des cellules permissives.

Les cellules NBE, KMST-6, SUSM-1 et A9 ont été infectées à M.O.I. 5. L'orthophosphate radiomarqué fut ajouté 10 heures plus tard ($^{32}\text{P}_i$; $66\mu\text{Ci/ml}$). Les extraits d'ADN extrachromosomal (B. Hirt 1967) ont été préparés 20 et 30 heures après infection et chargés dans un gel d'agarose à 1 % à raison de $8 \cdot 10^5$ cpm de DNA radiomarqué par échantillon. Le gel est séché après électrophorèse et autoradiographié.

lignées étudiées, les cellules transformées développent une plus grande capacité à amplifier l'ADN de MVMP ou H-1. Le rapport de quantité d'ADN entre 2 et 30 heures à M.O.I. 10^{-1} détermine le facteur d'amplification de l'ADN parvoviral, celui ci est 14 à 85 fois (virus H-1) et 10 à 23 fois supérieur dans les cellules transformées que leur cellules parentales normales. Il existerait donc une corrélation entre la capacité d'une cellule à amplifier l'ADN parvoviral et sa sensibilité à ces virus.

La cellule de référence A9 amplifie fortement l'ADN parvoviral, toutes les formes intermédiaires du cycle de répllication de cet ADN sont visibles après hybridation d'un southern blot d'extraits d'ADN extra-chromosomal (Hirt B. 1967) de cellules A9 infectées. La figure 4 (page 23) montre que les formes RF1 et RF2 sont nettement produites dans les cellules transformées contrairement aux cellules normales pour lesquelles ces formes sont très difficilement détectables, seule la forme simple brin (=ss) est clairement visible. La méthode utilisée ne permet pas de mettre en évidence la synthèse proprement dite de cet ADN, ni l'accumulation de formes simple brin neo-synthétisées. La figure 12 visualise cette synthèse (RF1 et RF2) et cette accumulation au sein des cellules de référence A9 et NBE. Dans ce cas, l'ADN nouvellement synthétisé est métaboliquement radiomarké avec du ^{32}P apporté dans le milieu de culture sous forme d'orthophosphate ^{32}P . Dans ce cas, il apparaît que les fibroblastes humains transformés accumulent très peu d'ADN simple brin (contrairement aux cellules A9) en dépit d'un haut taux d'amplification de l'ADN parvoviral, révélé entre autre par l'accumulation de nouvelles formes RF1 et parfois de RF2 (cellule KMST-6).

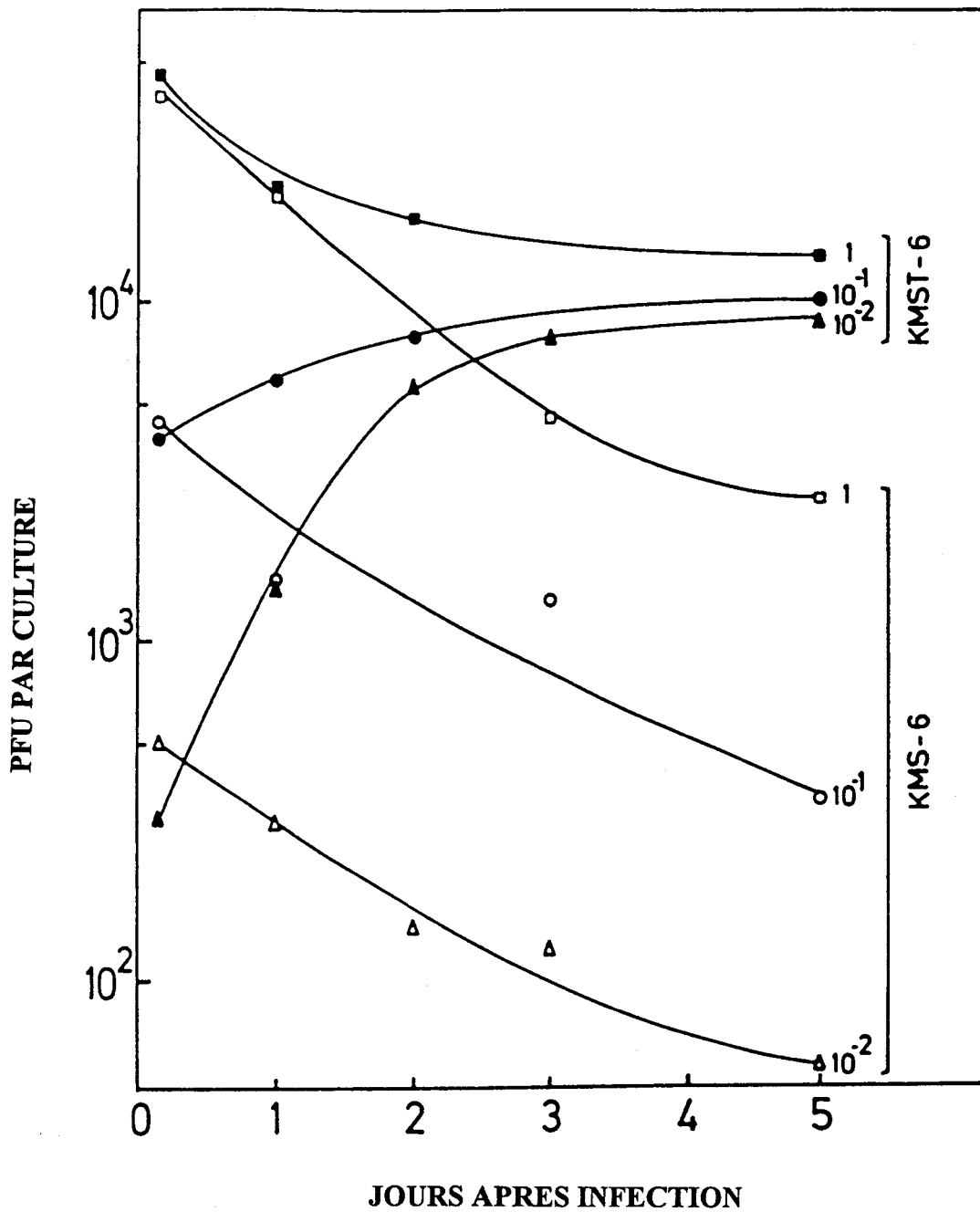


Figure 13: Devenir des particules infectieuses de MVMP dans les cellules humaines normales et transformées.

Les fibroblastes normaux KMS-6 et leurs dérivés transformés par les rayons γ (KMST-6) ont été infectés avec le virus MVMP à la M.O.I. indiquée dans le graphe et incubés de 1 à 5 jours. Le titre viral a été mesuré en fonction du temps après infection.

6.3.4. PRODUCTION DE VIRUS INFECTIEUX

Comme le démontrent les résultats des tableaux 5 et 6 (page 57), les cellules humaines normales ne produisent pas de parvovirus H-1 ou MVMP. Dans ce cas le titre viral chute avec le temps quelque soit la M.O.I. utilisée (Fig. 13 exemple de la cellule KMS-6). A l'opposé, l'ensemble des cellules humaines transformées testées ici parviennent à produire des quantités significatives de MVMP; la production de H-1 est par contre variable d'une cellule à l'autre. Seule la cellule SUSM-1 produit des quantités appréciables de virus (305 pfu/culture si infectée à M.O.I. 10^{-1}) alors que sa capacité à amplifier l'ADN viral est modérée (= 335 fois). La production de virus est faible (=14.5 pfu) pour la cellule WI38CT-1, et nulle pour la cellule KMST-6 qui amplifie pourtant très fortement l'ADN parvoviral (= 1 330 fois). Cette faible performance à produire des virus infectieux de la part des cellules humaines transformées est en relation avec leur faible capacité à accumuler de l'ADN neo-synthétisé simple brin.

Etant donné que la cellule la plus sensible (KMST-6) ne produise pas de virus et que la moins sensible (SUSM-1) soit la meilleure productrice, ceci nous incite à penser qu'il n'existe pas de corrélation entre sensibilité aux parvovirus et production virale et que par conséquent l'acquisition de la permissivité totale n'est pas une condition obligatoire pour la sensibilité des fibroblastes humains transformés à l'effet cytopathique du parvovirus.

6.4. CONCLUSIONS

Il apparaît donc qu'il y ait une corrélation entre la transformation maligne de fibroblastes humains et leur sensibilité aux parvovirus H-1 et MVMp, quelque soit l'agent transformant utilisé. Cette acquisition d'une hypersensibilité est à mettre en relation avec la nouvelle capacité de ces cellules à supporter l'amplification de l'ADN parvoviral bien que ce cycle de réplication ne débouche pas nécessairement sur une production virale infectieuse.

L'infection de fibroblastes humains normaux (originaires d'embryon, de nouveau-né ou d'adulte) est caractérisée par une adsorption normale de virus par la membrane, une très faible amplification de l'ADN viral et une production nulle de particules infectieuses (Chen et coll. 1986 - Ledinko et coll. 1969 - Singer et coll. 1978 - Toolan et coll. 1965). Le fait qu'aucune forme RF2 ou simple brin ne puisse être détectée dans ces cellules indique qu'elles manifestent une barrière au bon déroulement du cycle de l'ADN parvoviral.

S'il n'est pas nécessaire d'avoir une production de virus infectieux pour tuer la cellule, ceci nous permettait de penser que l'effet cytopathique des parvovirus devait être localisé au niveau des protéines non-structurales du virus étant donné que celles-ci sont produites à un taux nettement plus élevé dans les cellules transformées que dans les cellules parentales normales (Cornélis et coll 1988b).

CORRELATION
ENTRE TRANSFORMATION MALIGNNE
ET
SENSIBILITE AUX PARVOVIRUS



Figure 14: Gradient en taille des cDNA issus de la cellule sensible Ha cat10

Les cdNAs sont synthétisés à l'aide du kit commercialisé par Amersham en y incorporant du dCTP- $\alpha^{32}\text{P}$ (40 μCi). Ceux-ci sont séparés par leur taille en gradient de saccharose (5 - 25 %). Un aliquote (20 μl) de chaque fraction (500 μl) est chargé dans un gel d'agarose à 1 %. Le gel est séché et autoradiographié. Les fractions dont les cdNAs ont une taille supérieure à 500 bp sont recueillies.

7. SYNTHÈSE DIFFÉRENTIELLE DE FACTEURS CELLULAIRES EN FONCTION DE LA TRANSFORMATION CELLULAIRE

7.1. HYPOTHÈSE

Globalement, à l'opposé des cellules normales dont elles dérivent, les cellules transformées sont permissives aux parvovirus autonomes. Ce comportement peut être dû à une différence qualitative de production de certains facteurs cellulaires. Étant donné que dans les cellules transformées sont synthétisés des facteurs résultant de ou expliquant la transformation maligne, nous avons cherché à mettre en évidence un ou plusieurs de ces facteurs qui pourraient être susceptibles d'être impliqués dans la permissivité de ces cellules aux parvovirus. À cette fin, nous avons utilisé l'élégante technique de l'hybridation différentielle de cDNAthèque dont nous résumons ci-après le principe.

7.2. PRINCIPE DE L'HYBRIDATION DIFFÉRENTIELLE D'UNE cDNATHÈQUE

À l'aide du phage λ gt11 cultivé sur des bactéries Pop 136, nous avons construit une cDNAthèque à partir des ARNm messagers (poly A+) de la cellule sensible (transformée). Le spectre de taille en cDNA obtenus couvrait des cDNA de 0,15 à 7 kilo-paires de bases (Fig. 14). Les deux répliques (sur membrane de nitrocellulose) de cette banque sont ensuite hybridées respectivement par deux sondes cDNA simple brin A et B élaborés à partir des ARNm de la cellule sensible.

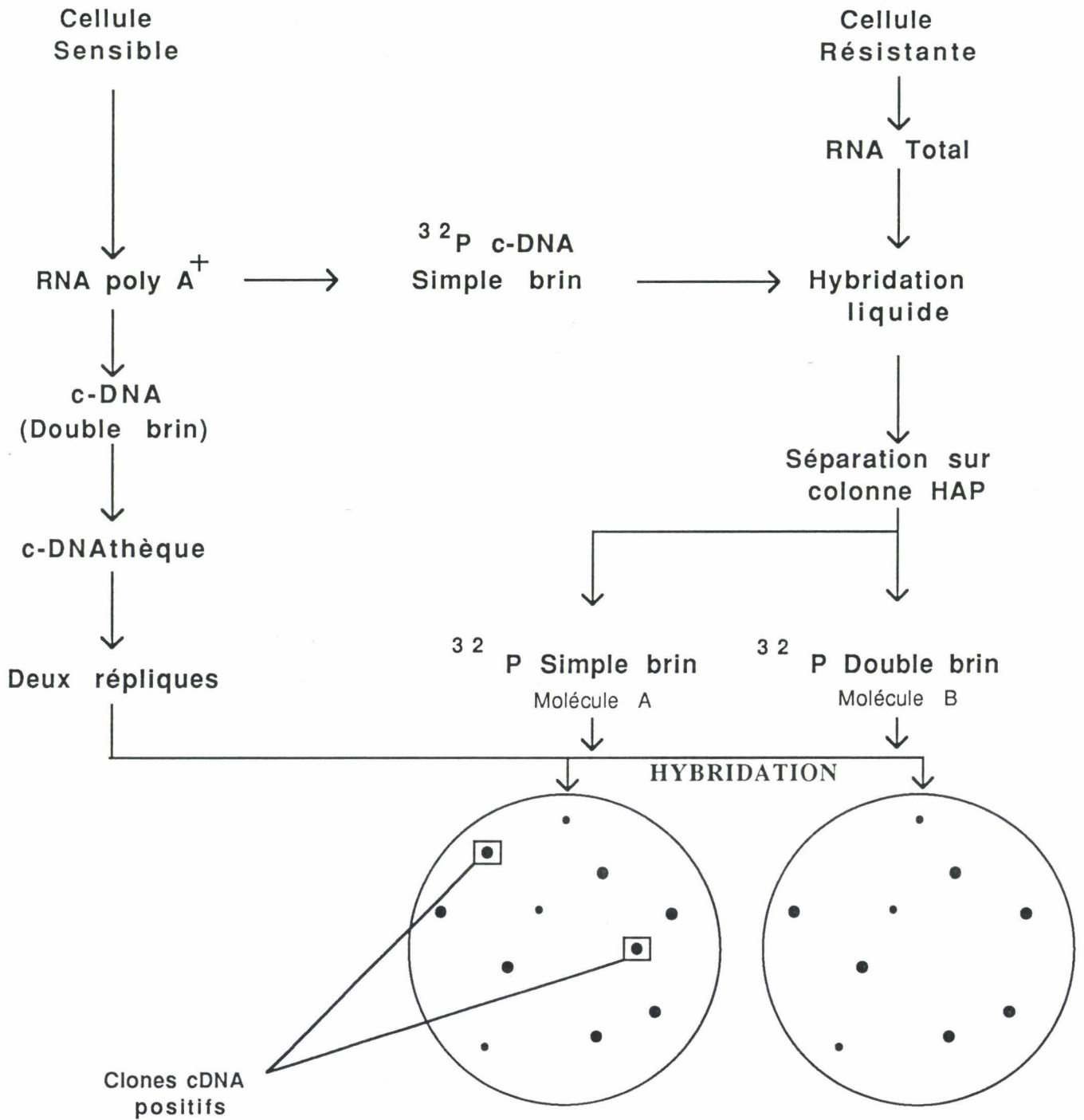
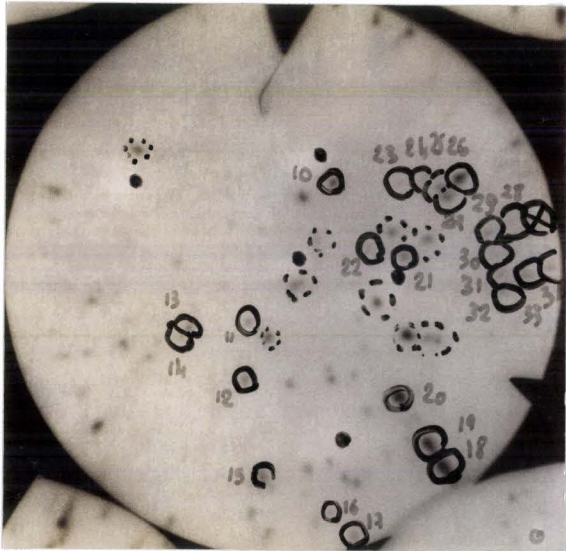


Figure 15: Principe de la technique d'hybridation différentielle d'une cDNATHÈQUE

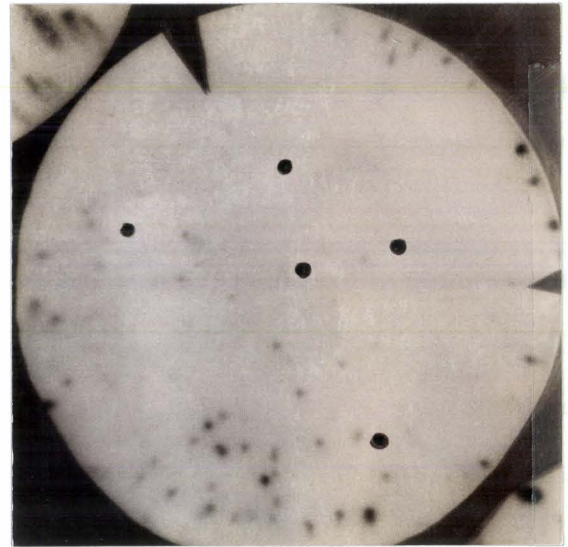
Ces deux sondes A et B (Fig. 15) ont été discriminées par un excès d'ARNm de la cellule résistante lors d'une hybridation liquide de 48 heures à 68°C avec tous les cDNA représentant la cellule sensible. Cette hybridation produit deux espèces de molécules. Les molécules "A" sont des cDNA (cellule sensible) non reconnus par les ARNm de la cellule résistante (molécule simple brin), les peptides qui en dérivent sont donc spécifiques de la cellule transformée utilisée. Les molécules "B" sont des cDNA reconnus par des ARNm (molécule double brin) et représentent donc les peptides communs aux cellules transformées et normales considérées. Une chromatographie en colonne d'hydroxyapatite permet ensuite de séparer ces deux types de molécules. Après une hydrolyse alcaline des ARNm, nous disposons de deux sondes (A et B) cDNA simple brin dont l'étude comparative du résultat de l'hybridation de celles-ci sur les répliques de la cDNATHèque permettra d'isoler un ou plusieurs clones cDNA spécifiques de la cellule sensible (transformée). En effet, un signal obtenu uniquement avec la sonde A identifie un phage contenant un cDNA dont la protéine apparentée est spécifique de la cellule transformée. Si tel n'est pas le cas, ce phage donnera à la fois un signal avec la sonde A et la sonde B, la protéine en question est donc commune aux cellules normales parentales et aux cellules transformées (Fig. 16).

Ces cDNA, isolés, sont ensuite testés en Southern Blotting (Fig. 17) pour déterminer leur taille après électrophorèse au gel d'agarose à 1 %, éventuellement éliminer les faux positifs (signal absent) ou encore repérer un phage qui aurait été le siège d'une recombinaison de plusieurs cDNA, dans ce cas il sera nécessaire de les séparer.

De manière quantitative, l'intensité du signal d'hybridation en Northern blotting devrait croître de façon parallèle avec l'augmentation de la sensibilité aux parvovirus au sein d'une famille de cellules transformées. A l'opposé, aucun signal ne devrait être



A



B

Figure 16: Hybridation différentielle de répliquas d'une cDNAthèque représentant la cellule sensible Ha cat10.

500 000 phages (par boîte) ont été déposés sur un tapis de bactéries Pop 136. Les 2 répliquas représentent la même boîte de culture. Les 5 symboles fermés (disposés en W) permettent d'orienter ces 2 répliquas lors de la comparaison du résultat d'hybridation respectivement avec la sonde cDNA A (réplique A) spécifique de la cellule sensible et la sonde cDNA B (réplique B). Les clones cDNAs positifs sont entourés en trait plein et numérotés. Les cercles pointillés présentent un doute à l'observation.

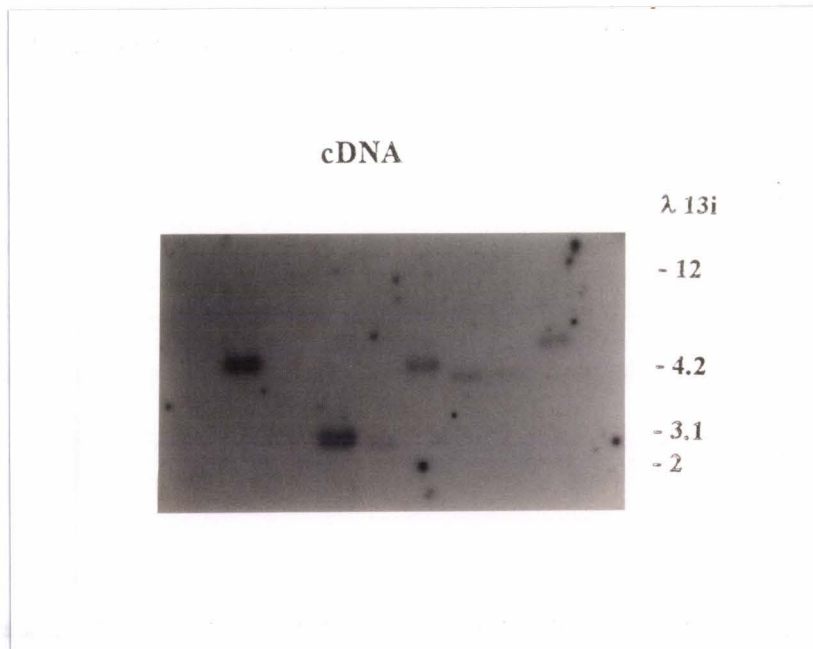


Figure 17: Détermination de la taille des cDNAs isolés.

2.5 µg de chaque cDNAs, isolés lors de l'hybridation différentielle des deux répliquas de la cDNAthèque puis amplifiés, ont été digérés par l'enzyme EcoR I puis déposés en gel d'agarose à 1 %. Ces cDNAs sont ensuite transférés sur une membrane de nitrocellulose et hybridés avec une population de sondes cDNA simple brin, radiomarquées avec le dCTP- $\alpha^{32}\text{P}$, représentant la cellule sensible Ha cat 10 dont ils sont issus. La taille est évaluée en comparaison du marqueur de taille: le phage $\lambda 13i$. La membrane est séchée et autoradiographiée. Les tailles sont indiquées.

observé avec des cellules normales. Si tel est le cas, les cDNA retenus sont séquencés et caractérisés.

7.3. SYSTEMES CELLULAIRES

Nous avons choisi deux systèmes cellulaires.

Le premier est un système thermosensible pour la permissivité au parvovirus MVMP. Les cellules NRK (cellules normales de rein de rat) transformées par un oncogène src thermosensible montrent un phénotype transformé à 34.5°C et révertant à 39.5°C. Ces cellules sont permissives à 34.5°C et résistantes à 39.5°C (température restrictive) à l'égard du parvovirus MVMP (Salomé et coll. 1989) (Fig. 8 page 28).

Le deuxième système est issu d'une collection de clones de kératinocytes humains transformés spontanément (Ha cat) montrant un gradient de sensibilité au parvovirus H-1 (Chen et coll. 1989) (Fig. 18). Dans ce système nous avons tenté de mettre en évidence une éventuelle induction de gènes cellulaires suite à une infection par le parvovirus H-1. Ainsi la cellule sensible (Ha cat 10) fut infectée à une M.O.I. de 3 (= 3 particules infectieuses par cellule), la cDNAthèque construite à partir de cette cellule, 18 heures après cette infection, fut éprouvée en regard du clone cellulaire le plus résistant (Ha cat 10R2).

Dans les deux cas, le gradient de sensibilité de kératinocytes offrait, de plus, l'avantage de montrer qu'il puisse exister une corrélation entre l'expression d'un ou plusieurs ARNm et la sensibilité de ces cellules au parvovirus. En effet, plus la cellule est sensible, plus l'expression du gène recherché sera importante.

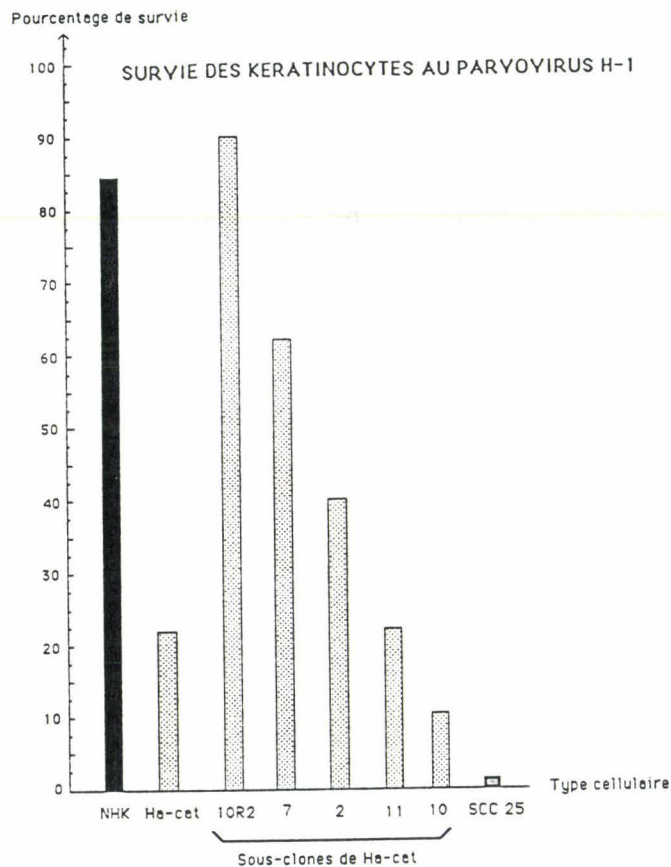


Figure 18: Gradient de sensibilité cellulaire des kératinocytes humains au parvovirus H-1 (Chen et coll. 1989)

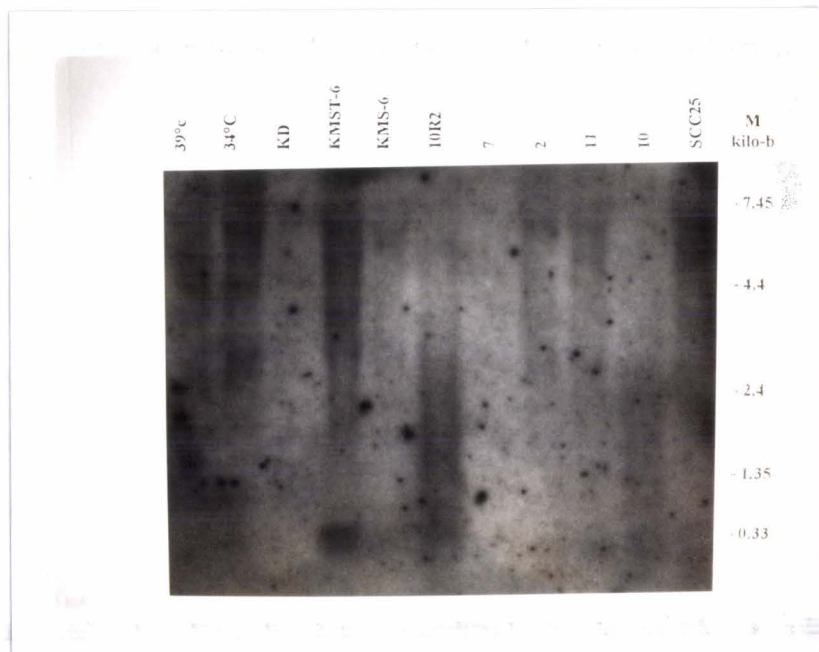


Figure 19: Identification d'ARN dont l'expression est liée avec la sensibilité cellulaire aux parvovirus.

12.5 µg d'ARN totaux extraits des cellules résistantes NRK-*src*-ts (à 39.5°C), KD (kératinocyte humain adulte), KM-S (fibroblaste d'embryon total), de cellules sensibles NRK-*src*-ts (à 34°C), KMST-6 (KMS transformée par les rayons γ), SCC25 (kératinocyte humain transformé) et de clones de kératinocytes Ha cat issus du gradient de la Fig. 16 (clones: 7 - 2 - 11 - 10) ont été déposés en gel d'agarose-MOPS à 1%. Après électrophorèse, les ARN séparés selon leur taille sont transférés sur une membrane de nitrocellulose et hybridés par une sonde cDNA, sélectionnée pour sa spécificité à l'égard de la cellule la plus sensible du gradient: Ha cat10, marquée par nick-translation avec du dCTP- $\alpha^{32}\text{P}$.

La membrane est séchée et surexposée en autoradiographie.

M: Marqueur de taille (RNA ladder).

7.4. RESULTATS ET CONCLUSIONS

Les écueils de cette méthode résident principalement, d'une part, dans le fait qu'il puisse y avoir au sein d'un même phage une recombinaison entre plusieurs cDNA, éliminant d'office des cDNA spécifiques de la cellule sensible, et d'autre part qu'un cDNA puisse être issu d'un ARNm extrêmement rare. Dans ce dernier cas, la visualisation en Northern blotting de ces ARNm était techniquement impossible. L'établissement répété de cDNAthèques et de sondes cDNA permettent de réduire (sans les éliminer) les inconvénients dus à une recombinaison aléatoire des cDNA entre eux.

C'est probablement pour ces deux raisons que nos recherches sur ce point ne permirent pas de mettre en évidence une différence qualitative entre des cellules sensibles et résistantes. En effet, les nombreux clones cDNA (150) (dont certains sont montrés sur la figure 16 (page 65), déterminés comme spécifiques de la cellule transformée, utilisés comme sonde, lors de l'hybridation de Northern blot réalisés sur le gradient cellulaire de kératinocytes, ne donnèrent pas d'image d'intensité croissante au fur et à mesure que la cellule testée fut sensible (Fig. 19).

Il est également possible que la différence de comportement, lié à la transformation maligne, entre une cellule résistante et une cellule sensible (transformée) vis-à-vis du parvovirus résiderait dans une possibilité de moduler la traduction d'ARNm cellulaires ou viraux, ou dans une capacité de modification, après traduction, de protéines cellulaires ou virales conduisant à des modifications métaboliques permettant de supporter un cycle parvoviral jusqu'à son terme. Ces 3 suppositions ne sont pas exclusives.

C'est pourquoi nous avons décidé de mettre au point un système cellulaire stable qui nous permette d'étudier l'impact cellulaire et moléculaire des protéines non-structurales du parvovirus MVMP en modifiant le génome cellulaire en y insérant des séquences parvovirales choisies (Cf. chapitre suivant).

SYNTHESE
DES PROTEINES NON-STRUCTURALES
DU PARVOVIRUS MVMp
PAR
DES RETROVIRUS RECOMBINES

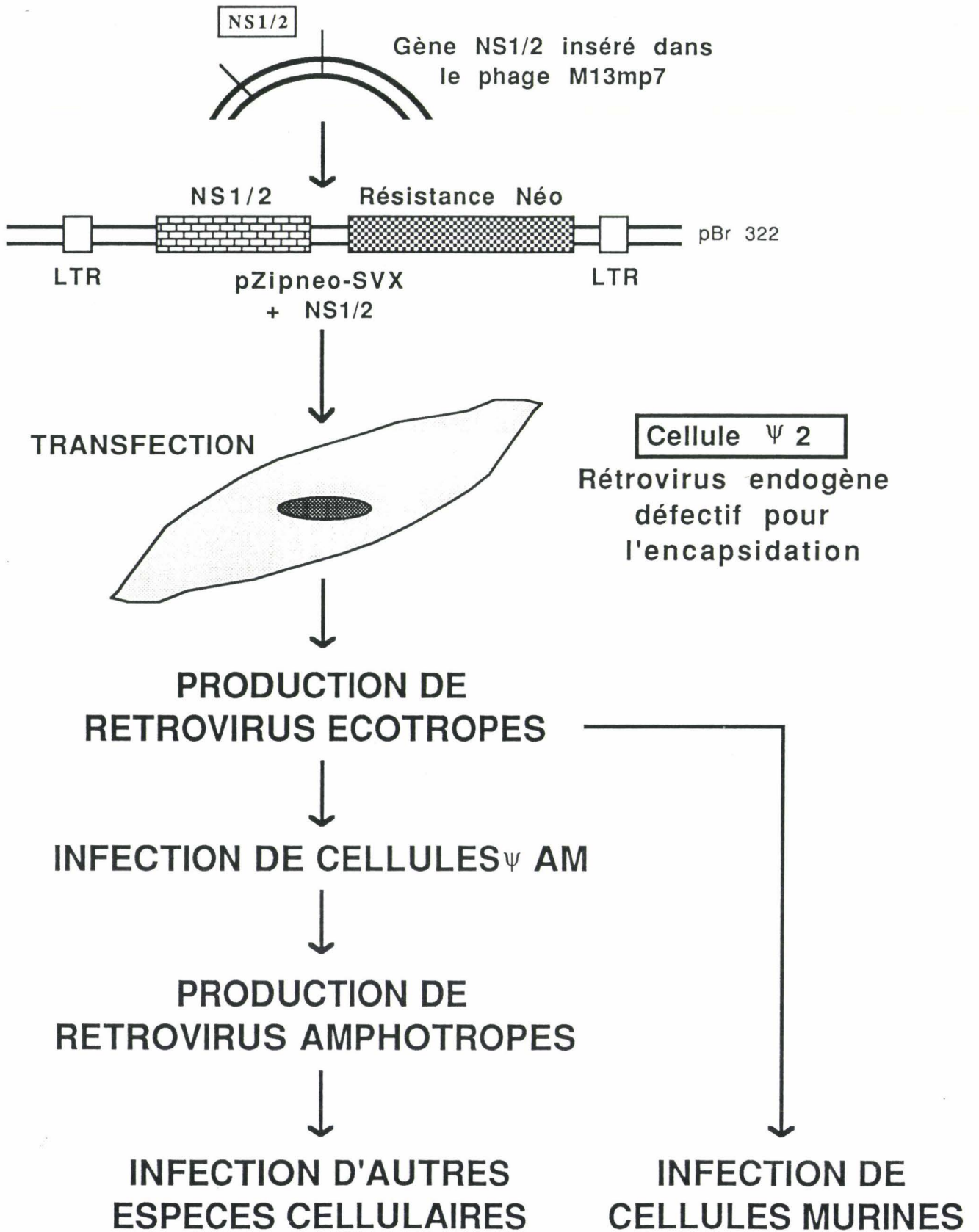


Figure 20: Système cellulaire produisant des particules rétrovirales recombinées

8. ETABLISSEMENT D'UN SYSTEME CELLULAIRE PRODUISANT DES PARTICULES RETROVIRALES INFECTIEUSES RECOMBINEES N'EXPRIMANT QUE LES PROTEINES NON-STRUCTURALES DU PARVOVIRUS MVMp

8.1. CHOIX DU SYSTEME

Pour isoler les protéines non-structurales de leur contexte viral nous pouvions nous limiter à transfecter ce gène dans un système cellulaire donné. La principale difficulté réside dans le rendement très faible de la transfection d'un ADN ainsi que dans le nombre très limité de cellules transfectables. Ces restrictions pourraient être levées si nous pouvions introduire cet ADN par un processus naturel efficace, répétitif et non astreint au type cellulaire. Le virus recombiné peut répondre à ces attentes (Miller et coll. 1989 - McLachlin et coll. 1990 pour revues). Dès lors, la transfection de cellules fibroblastiques ou épithéliales, pour lesquelles le rendement d'établissement de colonies transformées est très faible, sera abandonné au profit d'une infection dont le rendement, nettement plus élevé, est contrôlable et répétitif.

C'est pourquoi nous avons utilisé un système cellulaire développé avec succès par Cone et coll. (1987), Dzierzak et coll. (1988) et Cepko et coll. (1984). Il s'agit d'une cellule murine (Psi 2) qui, transfectée par un vecteur particulier (pZipneo-SVX), peut produire efficacement des particules rétrovirales recombinées contenant les séquences d'activation de la transcription du rétrovirus M-MuLV (Moloney Murine Leukemia Virus) flanquant une séquence étrangère insérée par l'expérimentateur. Les particules virales issues d'un tel système cellulaire sont utilisées pour infecter divers types de cellules (fibroblastique, épithélial, tumoral ou non), c'est la transduction de gènes étrangers d'une cellule à une autre (Fig. 20).

Il existe plusieurs intérêts liés à l'utilisation d'un tel vecteur:

- 1) Le vecteur pZipneo-SVX contient le gène de résistance à la néomycine, ainsi la transfection de celui-ci dans les cellules ne nécessite pas l'apport conjoint d'un plasmide portant un gène marqueur pour sélectionner les cellules transfectées.
- 2) La transfection de ce vecteur dans la cellule murine Psi 2 (100 % MVMp résistante) qui n'est autre qu'une NIH 3T3 transformée de manière stable par un rétrovirus M-MuLV endogène défectif pour l'encapsidation de son propre génome (Mann et coll. 1983), aboutit à la production de particules rétrovirales contenant l'ARN issu du vecteur (McLachlin et coll. 1990). En effet, celui-ci contient au niveau des longues répétitions terminales (LTR) ces signaux d'encapsidation. La complémentation en trans de ces deux génomes aboutit à l'encapsidation des séquences flanquées par les LTR dans une particule rétrovirale infectieuse.
- 3) Les particules rétrovirales sont écotropes, c'est à dire qu'elles n'infecteront que des cellules murines.
- 4) L'utilisation de diverses constructions (après délétion ou mutation) du gène parvoviral devraient permettre d'exprimer selon le cas les 2 protéines non-structurales, une seule ou des fragments peptidiques. Nous avons préféré insérer des séquences parvovirales génomiques parce que d'une part la séquence cDNA NS-1 totale comporte déjà des sites d'épissage pour générer l'ARNm R2 de NS-2 et d'autre part cette dernière existe en trois isoformes issues de 3 épissages alternatifs donc 3 cDNA (cf. 2.2).

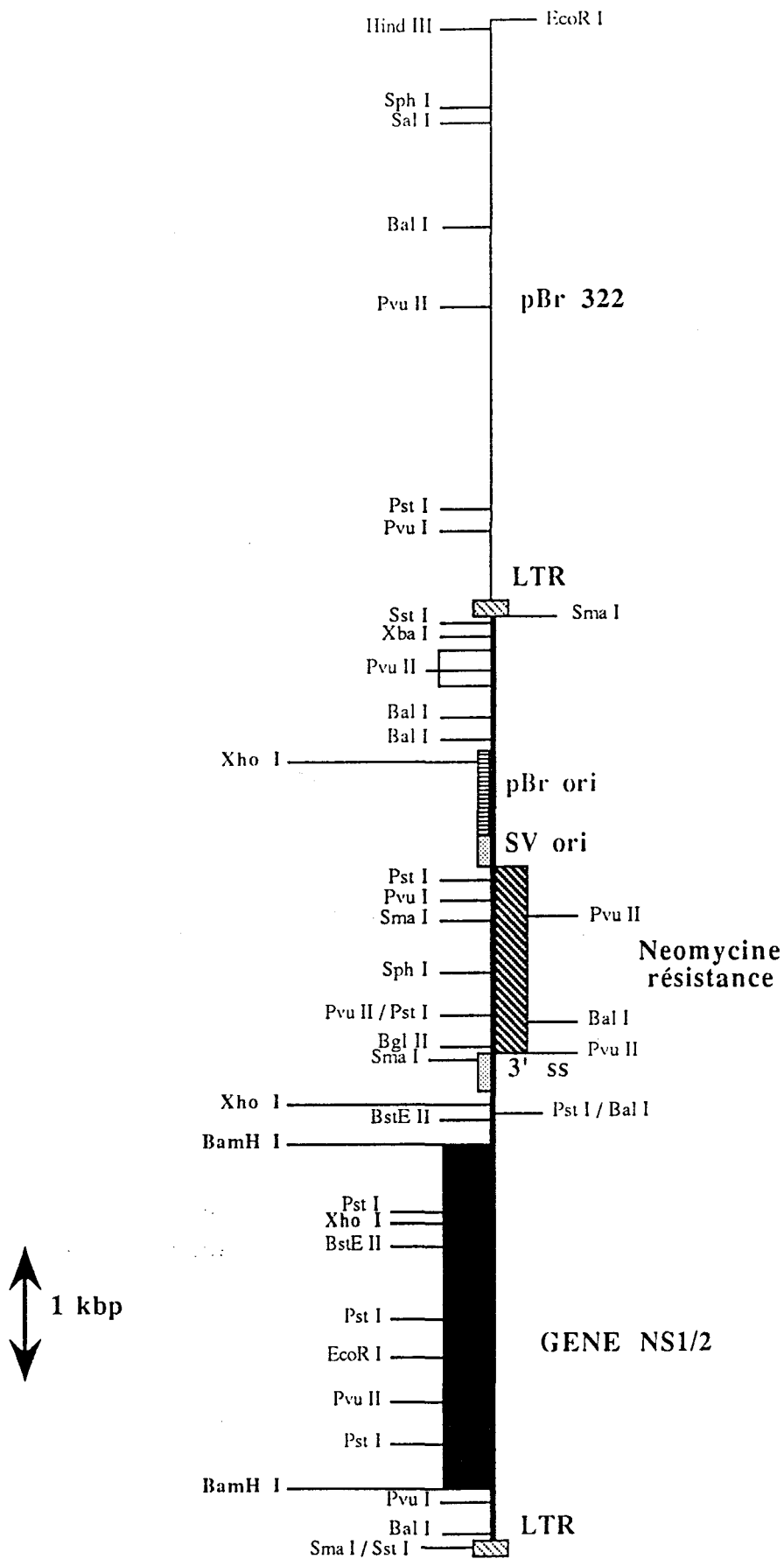


Figure 21: Carte de restriction du recombiné pZipneo-NS
(J.-M. Vanacker)

■ Gène NS1/2 inséré au site unique BamH I du vecteur pZipneo-SVX

5) L'insertion du gène NS-1/NS-2 et de ces mutants permettra d'étudier l'impact cellulaire et moléculaire de ces polypeptides en dehors des processus de réplication de l'ADN viral et d'accumulation des capsides parvovirales qui doivent intoxiquer la cellule infectée.

6) L'infection de cellules Psi AM par des particules rétrovirales, issues de cellules Psi 2, permet la production de particules rétrovirales amphotropes dont le contenu génomique est identique, elles peuvent donc infecter tous les types ou espèces cellulaires. Ce type de virus présente donc un danger puisqu'il peut aisément infecter l'expérimentateur ou son entourage en cas de dissémination involontaire. Ce système est donc abandonné dans l'état actuel de nos moyens de protection non prévus pour ce type de manipulation.

8.2. CONSTRUCTION DES RECOMBINANTS

La figure 21 représente la carte de restriction simplifiée du vecteur pZipneo-SVX dans lequel fut inséré le gène parvoviral NS-1/NS-2 dans le site unique de clonage BamH I en amont du gène de résistance à la néomycine. Les séquences LTR contiennent les signaux d'initiation de la transcription virale, de la polyadénylation des ARN viraux et de l'intégration du génome. Les séquences rétrovirales incluses dans le vecteur sont nécessaires pour la transcription reverse, l'encapsidation de l'ARN viral et contiennent également les sites d'épissage 5' et 3' impliqués dans la formation de l'ARN sous génomique env. Les séquences rétrovirales codant pour les polypeptides gag-pol et env ont été remplacés par deux sites de clivage d'endonucléase: BamH I et Xho I.

Dans ce dernier site fut inséré le gène de résistance à la néomycine ainsi que les origines de répllication de SV40 et pBR322 (Cepko et coll. 1984).

Au site BamH I, nous avons inséré 4 séquences issues de MVMp via le phage M13mp7NS qui constitue notre matériel de base. Ce phage est issu du phage M13mp7 dans lequel nous avons inséré, au site HinC II du polylinker, le fragment BssH II - BssH II du MVMp (isolant ainsi le gène NS-1/NS-2 avec le promoteur P4) dont les extrémités ont été rendues franches par l'enzyme Klenow.

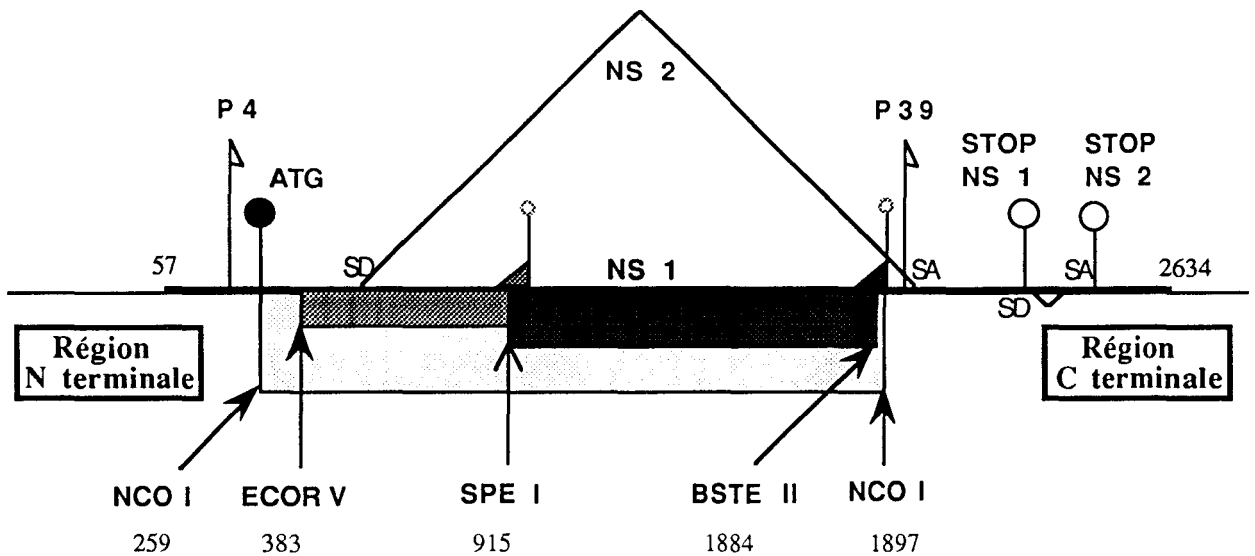
Ce fragment est ensuite extrait en digérant l'ADN du phage (appelé M13mp7NS) par BamH I pour l'introduire enfin dans le vecteur rétroviral. Les bactéries HB 101 transfectées par ce recombinant sont sélectionnées pour leur résistance à la kanamycine (ou ampicilline, le vecteur contenant le plasmide pBr322). L'orientation de l'insert est contrôlée en minigel d'agarose 1% après avoir digérer le vecteur par l'enzyme Xho I.

Ce premier construit appelé pZipneo-NS devrait produire les protéines NS-1 et NS-2. Si l'orientation du gène est opposée par rapport au sens de transcription du gène de résistance, le vecteur est noté (-)pZipneo-NS et la cellule (Exemple Psi 2): Psi(-)NS.

Les trois délétions suivantes dans le gène NS-1/NS-2 (dans le phage M13mp7NS) permirent de construire les recombinants suivants:

<u>ENZYMES</u>	<u>RECOMBINANT</u>	<u>PRODUCTION</u>
Spe I - BstE II	pZipneo-NS2	NS-2
Nco I	pZipneo-Ct	-
EcoR V - Spe I	pZipneo-Nt	-

Ct et Nt pour région amino (NH₂) terminale et carboxy (COOH) terminale de la protéine NS-1.



Séquence parvovirale insérée dans le vecteur pZipneo-NS1/2



DELETION NCO I - NCO I = pZipNeo-Ct

=> Pas de NS-2

=> Région C terminale de NS-1



DELETION ECOR V - SPE I = pZipNeo-Nt

=> Changement de cadre 3 → 1

=> Codon STOP au nucléotide 979

=> Région N terminale commune à NS 1 ET NS 2



DELETION SPE I - BSTE II = pZipNeo-NS2

=> NS 2

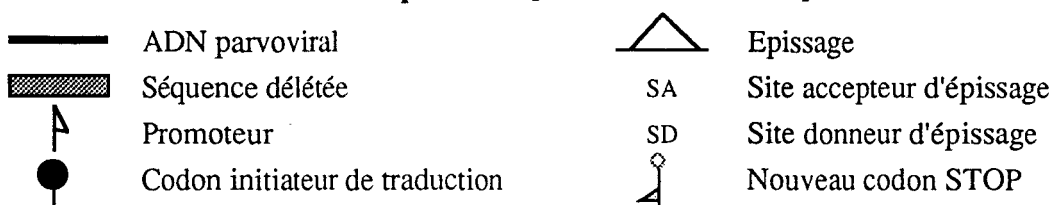
=> Changement de cadre 3 → 2

=> Codon STOP au nucléotide 1916

=> Région N terminale de NS-1

Figure 22: Constructions des vecteurs recombinés

Description des produits de transcription



Le détail des délétions et les produits de traduction attendus de ces constructions sont résumés dans la figure 22. La délétion Nco I - Nco I (pZipneo-Ct) entraîne la perte de la majeure partie de la séquence du gène hormis la partie C terminale qui reste en phase de lecture avec l'ATG initiateur original. par contre la délétion du fragment EcoR V - Spe I (pZipneo-Nt) entraîne la formation d'un codon stop à la position nt 979 et la disparition du site donneur d'épissage du grand intron, ainsi seule une partie de la région N terminale commune à NS-1 et NS-2 sera produite. Cette dernière protéine (NS-2) sera exprimée à partir du recombinant pZipneo-NS2, la délétion Spe I - BstE II entraînant la formation d'un codon stop à la position nt 1916 dans le cadre de lecture de la protéine NS-1, ainsi cette dernière sera privée de la majeure partie de sa séquence côté carboxyl.

Le vecteur pZipneo-SVX sans insert est utilisé comme témoin.

8.3. VERIFICATION IN VITRO DE L'EXPRESSION PARVOVIRALE

Sachant que la protéine NS-1 trans-active le promoteur parvoviral P38, nous avons vérifié par la technique du "CAT-ASSAY" (Gorman et coll. 1982) que les constructions ou plasmides devant produire NS-1 conservaient cette propriété.

Ainsi 5.10^5 cellules NBE (cellules humaines de rein de nouveau né transformées par le virus SV 40) ont été cotransfectées par 1 μ g d'ADN des différents recombinants et 1 μ g d'ADN du plasmide p38CAT. Ce dernier possède le gène de la Chloramphenicol-Acétyle-Transferase (CAT) sous le contrôle du promoteur parvoviral P38, trans-activable par la protéine NS-1.

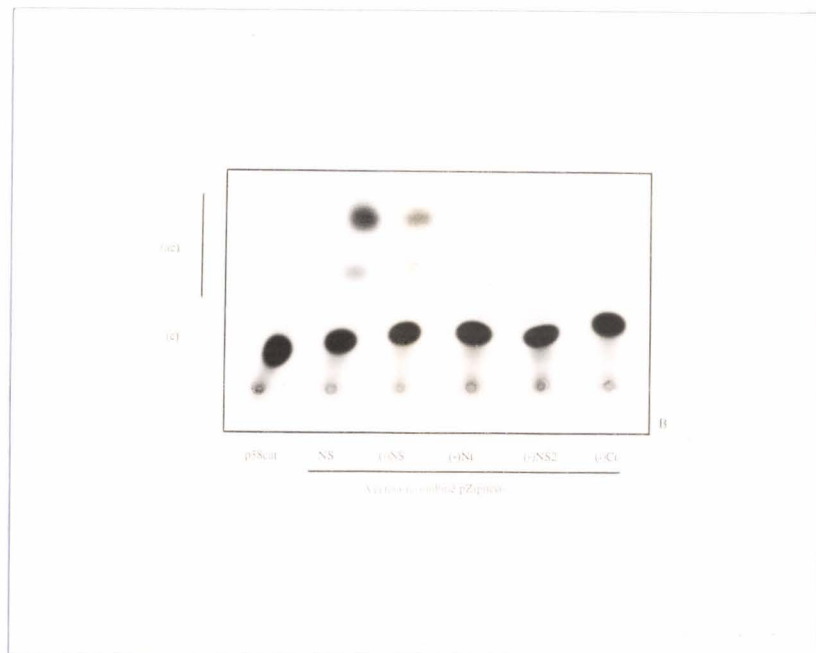
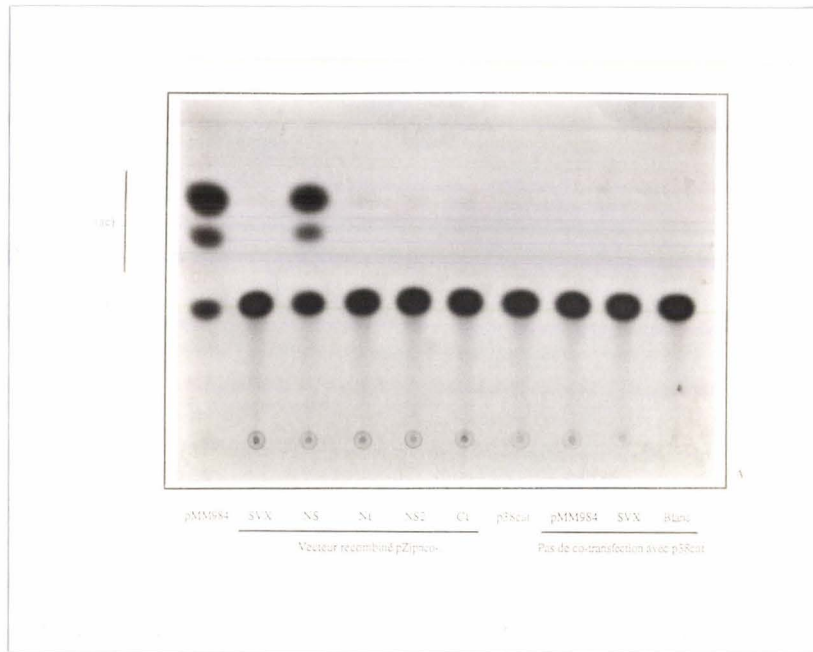


Figure 23: Test de trans-activation du promoteur parvoviral P38

par la technique du CAT-ASSAY (cf. Méthodes)

10^6 cellules NBE sont transfectées par $1 \mu\text{g}$ du vecteur étudié et $1 \mu\text{g}$ du plasmide marqueur p38CAT transportant le gène CAT sous le contrôle du promoteur parvoviral P38 trans-activable par la protéine NS-1. L'activité CAT est déterminée en incubant de $50 \mu\text{l}$ d'extrait cellulaires avec $0.1 \mu\text{Ci}$ de ^{14}C -Chloramphénicol pendant 2 heures à 37°C . Les positions du chloramphénicol non acétylé (c) et des 2 dérivés acétylés (ac) sont montrées.

pMM984: ADN viral infectieux de MVMp dans le plasmide pBr322. (Témoin positif).

Blanc: aucun plasmide transfecté (Témoin négatif).

(-): indique que la séquence parvovirale a été insérée dans le sens inverse de transcription du gène de résistance à la neomycine.

Si la trans-activation a lieu, le produit du gène CAT acétylera in vitro le chloramphénicol marqué au ^{14}C . Après chromatographie sur couche mince, ces produits sont visualisés en autoradiographie. Le plasmide pMM 984 contenant le génome infectieux du virus MVMP (Merchinsky et coll. 1983) constitue le témoin positif de cette trans-activation.

Dans toutes les constructions testées, seuls les recombinants pZipneo-NS et le plasmide pMM984 (produisant NS-1) trans-activent efficacement le promoteur P38 (Fig. 23A). Il en est de même si l'insertion du gène NS-1/NS-2 s'est réalisée dans le sens inverse de transcription du gène de résistance à la néomycine (Fig. 23B - recombinant pZipneo(-)NS). Ce dernier résultat atteste que la séquence codant pour les protéines non-structurales du parvovirus sont sous le contrôle du promoteur P4, bien que dans ce cas le signal soit plus faible. Enfin, il est à noter que la protéine NS-2 seule ainsi que les régions N terminales et C terminales de la protéine NS-1 ne trans-activent pas le promoteur P38.

Ainsi les recombinants sont fonctionnels en ce qui concerne production et activité de la protéine NS-1. L'inversion du sens d'insertion du gène NS1/2 affecte peu leur synthèse ce qui démontre bien que ce gène est sous le contrôle du promoteur parvoviral P4. Le vecteur est donc opérationnel.

8.4. TRANSFECTION ET SELECTION

Des cellules Psi 2 transfectées (méthode au phosphate de Calcium) par $10\ \mu\text{g}$ d'ADN de vecteur, avec ou sans insert, ont été sélectionnées en fonction de leur

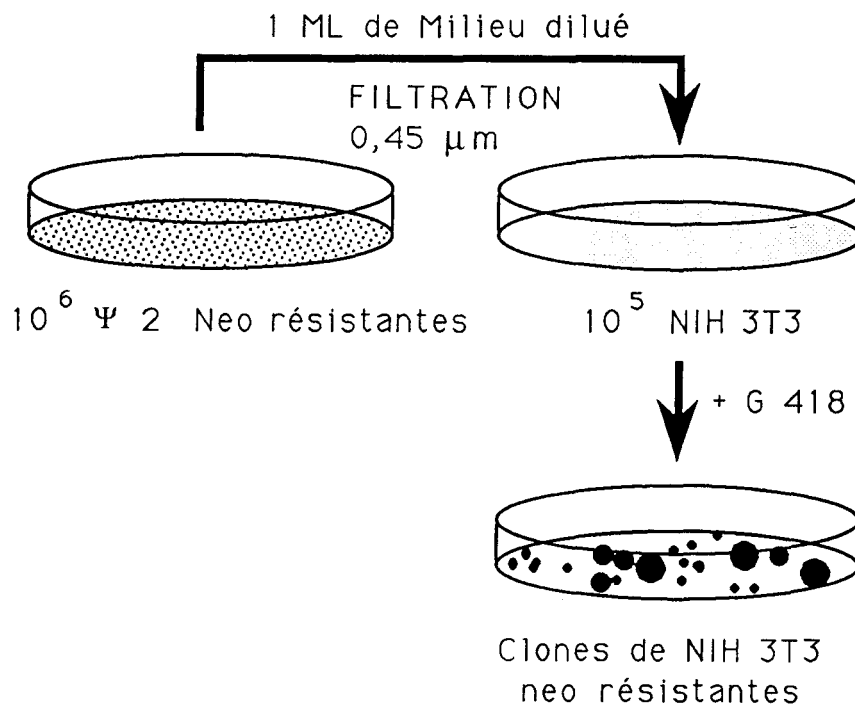


Figure 24: Sélection de cellules neo-résistantes après infection par un vecteur de type pZipneo-SVX recombiné.

résistance à la G418 (analogue de la néomycine) à 400 µg/ml de milieu. Un grand nombre de clones cellulaires Psi 2 neo-résistants (= résistants à la néomycine) furent sélectionnés quelque soit le vecteur utilisé.

Les cellules Psi 2 ne sont pas permissives au parvovirus MVMp. Le fait qu'il fut possible d'isoler des clones neo-résistants, transfectés par un recombinant produisant (en principe) les protéines non-structurales, indique qu'apparemment ces dernières ne peuvent exercer une action cytotoxique radicale au sein de ces cellules soit par défaut partiel ou total de production soit parce qu'elles ne trouvent pas d'environnement cellulaire leur permettant d'exprimer leur(s) activité(s).

8.5. PRODUCTION DE PARTICULES RETRO-PARVOVIRALES

Nous avons vérifié l'efficacité de ces cellules Psi 2 neo-résistantes à produire des particules rétro-parvovirales conférant une neo-résistance. A cet effet 10^6 cellules Psi2 neo-résistantes et 10^5 cellules indicatrices NIH 3T3 (résistantes à 95% à l'action lytique du parvovirus MVMp) sont ensemencées la veille. Le lendemain, 1 ml (millilitre) de milieu, conditionné par les cellules Psi 2 neo-résistantes, est filtré à travers une membrane dont la porosité est de 0.45 microns, puis appliqué sur les cellules NIH 3T3 en présence de Polybrène (4 µg/ml) pendant 2 heures (Fig. 24), ce dernier facilite l'adsorption des rétrovirus (Miller et coll. 1989). La sélection en présence de G418 (800 µg/ml), 24 à 48 heures après infection, permet d'établir pour chaque lignée de cellules Psi 2 un titre de production de particules rétrovirales formant une colonie de NIH 3T3 neo-résistantes (cfu par ml de surnageant de cellules Psi 2). Quelques résultats sont portés au tableau 7.

	N° du clone	Production de protéines parvovirales ^a	Production de particules rétrovirales (cfu/ml) ^b
Clones PsiNS	(-)b	+	12 000
	(-)f	nd	0
	a	nd	nd
	b	+	28
	i	+	8
	j	+	nd
Clones PsiNS2	(-)c	+	1
	(-)c2	+	27
	(-)d	+	0
	(-)e	+	7
	(-)f	+	16
	(-)g	+	2
	(-)j	-	0
	b	+	0
	e	+	0
	f	+	0
Clones PsiNt	c	-	260
Clones PsiCt	(-)d	-	2
	d	-	4

Tableau 7: Production de particules rétrovirales conférant une résistance à la G418

(^a) : synthèse des protéines NS-1 et/ou NS-2 détectées "+" ou non "-" par immunoprécipitation ou western blot selon les procédés exposés dans le chapitre "Méthodes". nd: non déterminé.

(^b) : Nombre de particules rétrovirales infectieuses par ml de milieu conditionné pendant 1 heure par des cellules Psi 2 neo-résistantes et conférant une neo-résistance stable par transduction du gène de résistance à la neomycine.

(-): signifie que la séquence parvovirale a été insérée dans le sens contraire de transcription du gène de résistance à la neomycine;

Il apparaît, au vu de ces résultats, que les cellules Psi 2 transfectées par un recombinant pZipneo-... produisent des particules rétrovirales pouvant conférer une neo-résistance. Cette production stable est toutefois très variable d'un clone cellulaire à l'autre, de 0 à 10^4 cfu/ml. Cepko et coll. (1984) rapportent des productions de 10^4 cfu/ml dans le cas de séquences cDNA insérées. Les séquences parvovirales contenant des sites d'épissage, il est vraisemblable que l'épissage sub-génomique opérant dans les systèmes rétroviraux ne permette pas d'obtenir des titres élevés de production de particules virales "conférant une neo-résistance" (Cepko et coll. 1984). A ce propos les vecteur possédant un insert retourné produisent globalement plus de particules virales conférant une neo-résistance que les autres.

L'autre raison est que nous transférons, en plus d'une résistance à la néomycine, une séquence dont l'expression produit une toxine (NS-1). Ces faibles titres de production virale reflètent peut-être ainsi l'antagonisme "toxine + clone cellulaire survivant à un antibiotique". Nous sélectionnons probablement des clones cellulaires résistants à la neomycine pour lesquels l'expression des protéines non-structurales (si elle existe) est insuffisante ou inefficace pour tuer la cellule NIH 3T3. Ceci ne remet pas en cause notre outil. En effet, cette production de particules rétrovirales contenant un gène parvoviral fut mise à profit pour sélectionner des clones cellulaires neo-résistants de NIH 3T3 et A9 (variants de la lignée L de souris, 100 % sensible à MVMP, utilisée comme cellule indicatrice pour ce virus) afin d'appréhender le(s) rôle(s) des protéines NS-1 et NS-2 ainsi que l'éventuelle synergie entre elles pour tuer la cellule.

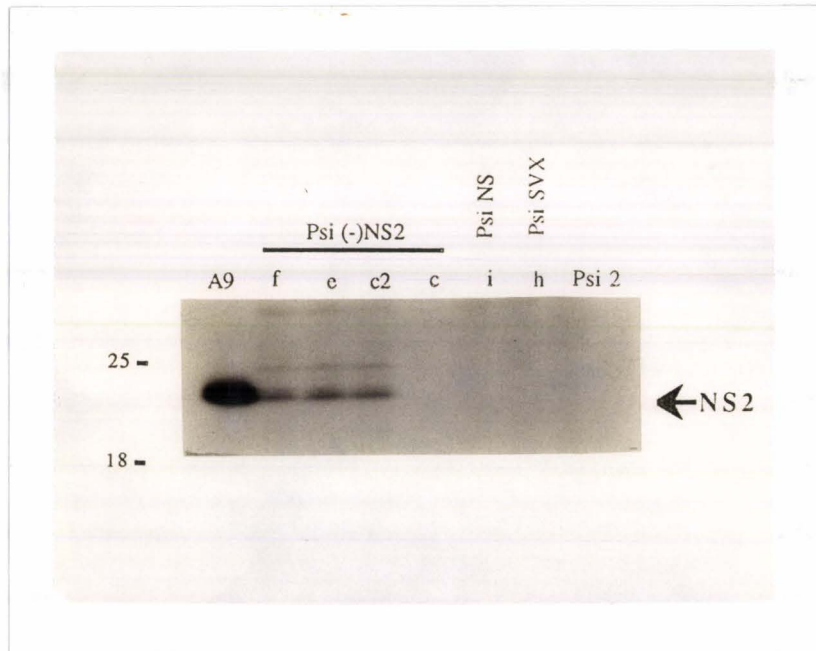


Figure 25: Expression des protéines parvovirales de MVMp (Immunoprécipitations)

Electrophorèse en gel de polyacrylamide de polypeptides radiomarqués avec de la L-méthionine-³⁵S (200 µCi / boîte) 1 heure à 37°C et immunoprécipités par des anticorps spécifiques (cf. Texte). les cellules A9 indicatrices sont infectées à M.O.I. 3 et radiomarquées 18 heures après infection. 5.10⁶ cpm des protéines marquées totales sont utilisées pour chaque immunoprécipitation. Les poids moléculaires du marqueur sont montrés.

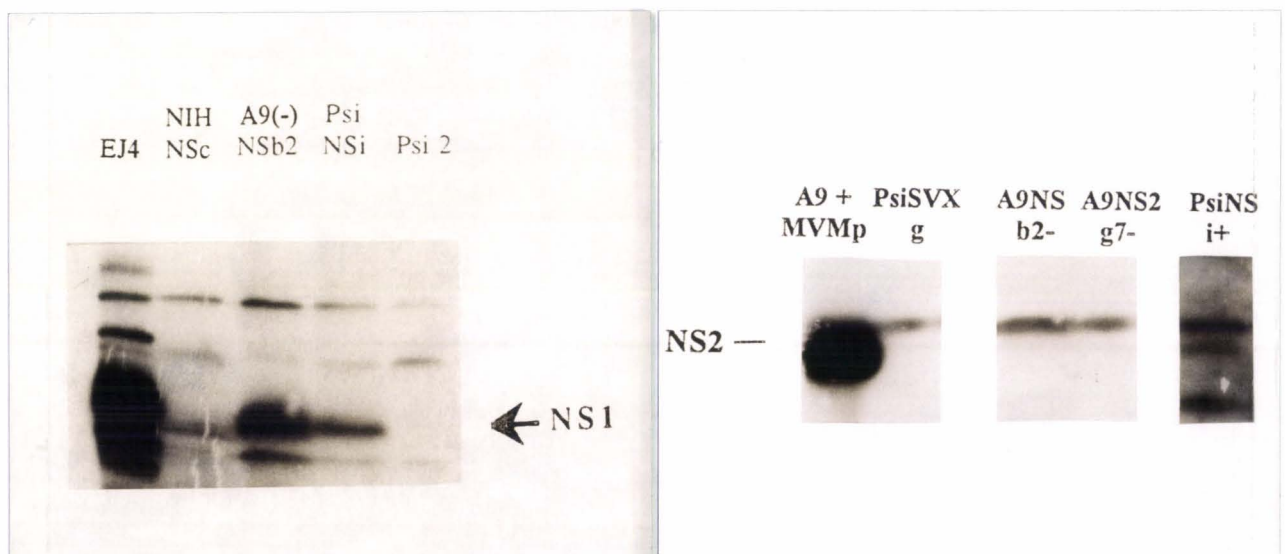


Figure 26: Expression des protéines parvovirales de MVMp (Western blot)

10⁶ cellules sont lysées. les polypeptides sont séparés lors d'une électrophorèse en gel de polyacrylamide. Après transfert sur une membrane "Immobilon", ces polypeptides sont reconnus par des anticorps polyclonaux anti NS-1 ou NS-2 radiomarqués avec de la protéine A sépharose iodée (¹²⁵I 0.1 µCi par membrane). Les cellules EJ-4 et A9 infectées par MVMp (M.O.I. 3) indiquent la position des protéine NS-1 et NS-2 (Témoins positifs).

8.6. SYNTHÈSE DES PROTÉINES PARVOVIRALES

L'immunoprécipitation, à partir de lysats cellulaires, des protéines marquées *in vitro* avec la L-méthionine-³⁵S, par des anticorps dirigés spécifiquement contre NS-2 (l'épitope se trouvant côté C terminal dans le cadre de lecture de cette protéine), mit en évidence la synthèse des isoformes de cette protéine dans la plupart des cellules Psi 2 ayant acquis le recombinant pZipneo-NS2 (Fig. 25). Les immunoprécipitations ont été réalisées à partir de lysats cellulaires (également pour la cellule témoin A9 infectée) contenant la même dose de radioactivité (5.10^6 cpm). On constate donc que le niveau intracellulaire de NS-2, dans tous les clones étudiés, est nettement inférieur à celui de la cellule indicatrice A9. Le sens d'insertion n'a aucune influence à ce niveau.

L'utilisation d'anticorps anti-NS1 (épitope localisé dans le grand intron) ou NS2 ne permet pas de détecter, après immunoprécipitation, une synthèse de ces protéines dans les cellules transfectées par le recombinant pZipneo-NS (Fig. 25 cas exemplaire de la cellule Psi NSi). Ces protéines sont cependant détectées après transfert sur une membrane "immobilon" (western blotting), dans ce cas les protéines NS1 et NS2 ne sont visibles qu'après une longue exposition en autoradiographie (Fig. 26). Là encore, le taux intracellulaire de ces protéines est inférieur à celui observé dans la cellule de référence EJ4 (Salomé et al. 1990).

Il apparaît donc que les recombinants doivent être soumis à une répression à un quelconque niveau les empêchant de produire en grande quantité les protéines parvovirales. Artelt et coll. (1991) décrivent que le gène de résistance à la néomycine inséré dans un vecteur rétroviral réduit l'expression des promoteurs de celui-ci de 10

fois. Le promoteur P4 pourrait être sensible à cet effet ce qui expliquerait la faible intensité des signaux recueillis.

D'autre part, le fait que nous ayons inséré des séquences parvovirales contenant leurs sites d'épissages originels dans un vecteur qui contienne déjà un site donneur et un site accepteur de part et d'autre du site d'insertion BamH I, un épissage ("non légitime") entre ces divers sites pourrait intervenir et perturber ainsi la synthèse des protéines.

Ces essais furent effectués également sur les cellules NIH 3T3 et A9 infectées par des rétrovirus recombinés. Les protéines non-structurales ne purent être détectées qu'après leur transfert sur une membrane "immobilon" (Fig. 26 page 77). Les taux relevés sont également inférieurs à la cellule de référence utilisée.

Ainsi la transduction de séquences parvovirales par ce vecteur pZipneo-SVX se réalise.

8.7. EFFETS BIOLOGIQUES DES PROTEINES PARVOVIRALES

8.7.1. EFFET CYTOTOXIQUE

Afin de mettre en évidence le rôle cytotoxique pressenti des protéines parvovirales NS-1 et/ou NS-2, nous avons, après l'établissement des colonies de cellules Psi 2, NIH 3T3 et A9, mesuré le pourcentage de cellules pouvant former des clones cellulaires ("plating efficiency"). Les résultats sont résumés dans le tableau 8.

	N° du clone	Production de NS-1 ^a	NS-2 ^b	Plating efficiency (%) ^c
Clones PsiNS	(-)b	+	nd	35
	i	+	+	32
	j	+	nd	9
	b	+	nd	45
				(30 ± 15 %) ^d
Clones PsiNS2	(-)g		+	73
	(-)h	-	+	33
	(-)k		+	nd
	b	-	+	49
	e		+	88
	j		nd	66
				(61 ± 21 %) ^d
Clones PsiSVX	g	-	-	63
	h	-	-	73
				(63 ± 10 %) ^e
Cellules Psi 2		-	-	53

Tableau 8: Synthèse des protéines NS-1 et NS-2 et "plating efficiency"

des clones cellulaires Psi 2 neo-résistants

Extrait des résultats sur l'expression des protéines NS-1 (^a) et NS-2 (^b) et mesure de la clonogénicité sur support plastique. Les immunoprécipitations et western blots ont été réalisés comme décrits dans le chapitre des méthodes. +: la protéine est synthétisée ; - : protéine non détectée. (-): indique que la séquence parvovirale est insérée dans le sens contraire de transcription du gène de résistance à la neomycine; nd: non déterminé.

(^c): Pourcentage des clones cellulaires se développant après (1 à 2 semaines) un ensemencement de 100 cellules considérées. (^d): moyenne et déviation standard des résultats de plating efficiency. (^e) moyenne et déviation standard des résultats de plating efficiency pour les clones PsiSVX et les cellules Psi 2.

8.7.1.1. SYSTEME CELLULAIRE PSI 2

Il apparaît à la lecture du tableau 8 que les clones cellulaires transfectés par le vecteur pZipneo-NS accusent une diminution de leur "plating efficiency" ($30 \pm 15 \%$) comparativement aux cellules Psi 2 non transfectée ($53 \pm 5 \%$) et aux clones cellulaires sélectionnés après leur transfection par les vecteurs pZipneo-SVX ($63 \pm 10 \%$) et pZipneo-NS2 ($61 \pm 21 \%$). Dans ce dernier cas et contrairement aux observations de Clemens et coll. (1990), l'expression de NS-2 ne semble pas affecter l'étalement cellulaire ("plating efficiency"), ces mêmes cellules ne présentent aucun signe indiquant une souffrance cellulaire, cette protéine ne développerait donc pas à priori de cytotoxicité. Nous avons par ailleurs constaté que ces cellules, exprimant la NS-2 seule, étaient nettement plus difficile à détacher de leur support de culture dans les conditions habituelles de subculture (Versène trypsine). La raison est inconnue.

La cellule Psi 2, résistante à l'infection par le virus MVMP, est néanmoins sensible à l'expression conjointe des protéines NS-1 et NS-2. La cellule présente des signes évidents de souffrance cellulaire: inclusions, filaments, réfringence accrue (données non montrées). NS-2 n'apparaissant pas comme cytotoxique, la protéine NS-1 apparaît comme étant la seule responsable de l'état de souffrance des cellules Psi 2. Toutefois il est possible de cultiver indéfiniment ces clones cellulaires dont l'expression des protéines parvovirales est toujours détectable. Deux hypothèses peuvent expliquer ce fait:

- il est possible que cette cellule ne puisse répondre radicalement aux fonctions cytocides de NS-1. L'environnement cellulaire n'apporterait pas suffisamment "d'éléments" pour que la cytotoxicité des protéines de MVMP puisse pleinement s'exprimer;

	N° du clone	Plating efficiency (%) ^a	
Clones A9(-)NSb	1	26	
	2	29	
	3	43	
	4	19	
	5	11	(26.3 ± 9.4 %) ^b
	6	27	
	7	31	
	8	26	
Clones A9(-)NS2g	1	85	
	7	70	(données insuffisantes)
Clones A9SVX	1	51	
	2	43	
Cellules A9	-	56	(50 ± 3.3 %) ^c

Tableau 9: "plating efficiency" des clones cellulaires A9 neo-résistants infectés par des rétrovirus recombinants

(^a): Pourcentage des clones cellulaires se développant après (1 à 2 semaines) un ensemencement de 100 cellules A9 déjà sélectionnées pour leur résistance à la G418 (300 µg/ml).

(^b): moyenne et déviation standard.

(^c): moyenne et déviation standard pour les clones A9SVX et cellules A9.

- le taux intracellulaire de ces protéines observé précédemment serait insuffisant pour tuer rapidement la cellule dans ce cas on peut supposer que la cellule meure d'un empoisonnement progressif;

Ces cellules constituent donc déjà un matériel de choix pour étudier l'impact moléculaire des protéines NS-1 et NS-2.

8.7.1.2. SYSTEMES CELLULAIRES NIH 3T3 ET A9

L'infection de cellules NIH 3T3 par les différents rétrovirus recombinés nous permet d'établir des clones cellulaires résistant à la néomycine (800 µg/ml de G418). Les cellules infectées par un vecteur pZipneo-NS montrent une tendance (échantillonnage non représentatif) vers un "plating efficiency" réduit (32.3 ± 19.3 %) par rapport aux contrôles (50 ± 5 %). Les clones transformés par un vecteur pZipneo-NS2 montrent également une meilleure adhérence au support de culture.

Les cellules A9 sont extrêmement sensibles à l'action cytocide du parvovirus MVMP, c'est probablement pour cette raison qu'il fût très difficile d'isoler des clones neo-résistants (300 µg/ml G418) infectés par une particule rétrovirale pZipneo-NS, la plupart des clones périlcliaient rapidement. La cellule A9 présenterait un environnement plus réceptif à la cytotoxicité de la protéine NS-1. Les clones A9, sélectionnés pour leur neo-résistance après infection par un vecteur pZipneoNS, montrent un "plating efficiency" réduit (26.3 ± 9.4 %) par rapport au contrôle (50 ± 7 %) (Tableau 9).

9. CONCLUSIONS

9.1. SYSTEMES CELLULAIRES STABLES

Nous avons pu établir un système cellulaire Psi 2 stable exprimant soit la protéine non-structurale de MVMp NS-2 seule soit les 2 protéines NS-1 et NS-2. Cette cellule génère des particules rétrovirales permettant le transfert de séquences parvovirales à d'autres types cellulaires et ce de façon également stable.

Ainsi, il sera désormais possible d'utiliser cet outil

- pour étudier l'impact cellulaire et moléculaire des protéines non-structurales du parvovirus et ce en absence de tous processus de réplication de l'ADN parvoviral qui détournent à leur profit des fonctions cellulaires vitales.

- pour ne plus se limiter à quelques types cellulaires utilisables en transfection. On pourra donc infecter des cellules spontanément transformées, des cellules normales d'adulte, d'embryon. Enfin l'emploi de virus amphotropes nous permettra d'ignorer la spécificité d'espèces des rétrovirus.

9.2. ANALYSE PROTEIQUE

La grande majorité des clones Psi 2 neo-résistants obtenus ici produisent les protéines non-structurales NS-1 et NS-2. Cette synthèse est également détectée dans les cellules (NIH 3T3 et A9) infectées par des rétrovirus recombinés pour lesquels on

avait constaté cette synthèse en Psi 2. Dans tous les cas, le taux intracellulaire de ces protéines est nettement inférieur à celui communément trouvé dans une cellule de référence infectée par le parvovirus MVMp.

La protéine NS-1 est connue pour exercer des activités de régulation de certains promoteurs, elle trans-inhibe entre autres son propre promoteur P4. En 1969, Bergs démontra que le parvovirus de Rat supprimait l'induction de la leucémie induite par le virus Moloney MuLV. Cette interférence est le résultat d'une inhibition des LTR de ce rétrovirus par les protéines non-structurales de MVMp (Legendre et coll. 1992). Or les LTR contenus dans le vecteur sont issus du Moloney MuLV et pourraient, tout comme le promoteur P4, subir une inhibition par les NS.

Le CAT-ASSAY est une technique très sensible qui permet de mettre en évidence l'activité d'un promoteur. Dans notre cas, il témoigne de la synthèse de la protéine NS-1 car celle-ci trans-active le promoteur P38 situé en amont du gène CAT. Il n'est pas possible, dans notre cas de démontrer une inhibition partielle des promoteurs nommés précédemment par cette technique en effet le P38 est rapidement saturé par l'effet trans-activateur de la protéine NS-1 (Cornélis, communication personnelle).

Artlet et coll. (1991) montrent que le gène de résistance à la neomycine cloné dans un vecteur rétroviral peut réduire de 10 fois l'activité des promoteurs des LTR. Etant donné que la protéine NS-1 peut trans-inhiber le P4 et le LTR du vecteur pZipneo-SVX, on peut imaginer qu'il existe une forme de parenté de configuration de ces 2 promoteurs et que de ce fait le produit du gène de résistance pourrait exercer une régulation négative sur le P4.

La raison de cette expression réduite reste encore à être élucidée.

Cellules	Virus	Dose ^a	Survie cellulaire (%)
WI38	H-1	CV5	82 ^b
WI38	H-1	5	35 ^b
PsiNS2b	MVMp	CV5	47 ^c
PsiNS2b	MVMp	5	55 ^c
PsiNS2b	MVMp	0	50 ^c
Psi(-)NS2g	MVMp	CV5	55 ^c
Psi(-)NS2g	MVMp	5	54 ^c
Psi(-)NS2g	MVMp	0	48 ^c

Tableau 10: Influence des capsides vides de parvovirus sur la survie cellulaire

^a: La dose de capsides vides pour l'infection a été déterminée selon le test d'hémagglutination décrit dans le chapitre des méthodes. CV5: signifie une quantité de capsides vides équivalente à la quantité de particules virales (infectieuses ou non) présentes lors d'une infection à M.O.I. 5 (notifiée par le chiffre 5).

^b: La survie cellulaire est déterminée en comptant la proportion de cellules vivantes 5 jours après infection par rapport à une culture contrôle non infectée. Survie cellulaire = $100 - (\text{Nombre de cellules vivantes à M.O.I. 5} / \text{nombre de cellules vivantes à M.O.I. 0}) \times 100$.

^c: La survie cellulaire est déterminée en comptant le pourcentage de cellules survivant à une infection et pouvant former une colonie.

(-): signifie que la séquence parvovirale est insérée dans le sens opposé à la transcription du gène de résistance à la neomycine.

Quoiqu'il en soit, la synthèse de ces protéines a bien lieu et les fonctions de cytotoxicité qui leur sont associées sont bien présentes. Nous possédons donc maintenant des cellules qui produisent de manière constitutive les protéines non-structurales du parvovirus MVMp.

9.3. IMPACTS CELLULAIRES ET MOLECULAIRES

Quelque soit le système cellulaire utilisé ici, l'expression conjointe de NS-1 et NS-2 entraîne une diminution du "plating efficiency" (capacité de former une colonie). Ce résultat n'est pas observé quand seule la protéine NS-2 est exprimée.

Etant donné d'une part que l'effet cytocide est ici indépendant:

1) de tous processus de réplication de l'ADN parvoviral, qui nous l'avons vu est en corrélation avec la sensibilité aux parvovirus (Cornélis et coll 1988a - 1988b);

2) de l'accumulation des nouvelles particules infectieuses.

et d'autre part que l'infection de particules vides n'entraîne aucun effet cytopathique (Tableau 10), il apparaît que la cytotoxicité des parvovirus se localise au niveau de la seule protéine non-structurale NS-1.

Dans de récents articles, il fut démontré que la protéine NS-2 jouait un rôle indispensable (cellule spécifique) dans les mécanismes d'amplification de l'ADN parvoviral (Naeger et coll. 1990), de traduction des ARNm parvoviraux et de production de particules virales infectieuses (Li et coll. 1991). L'absence de cette protéine se traduisant macroscopiquement par une chute de la production virale.

En 1990 Clemens et coll. "observèrent" que la protéine NS-2 pourrait exercer une cytotoxicité, plus faible que NS-1, à l'égard d'une cellule transfectée par un vecteur

d'expression contenant le cDNA NS-2 sous le contrôle d'un promoteur modulable: LTR du MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus). Les cellules ainsi transformées périssaient quelques semaines après la transfection. Clemens conclut en prévoyant une cytotoxicité de la part de NS-2 sans tenir compte du fait qu'il obtient des résultats identiques en transfectant un cDNA de protéine de capsid (VP1) réputée non cytotoxique.

Nos résultats ne confirment cette conclusion ni ne l'infirmement. En effet les cellules sélectionnées ici produisent des taux intracellulaires de NS-2 inférieurs à ceux déterminés par Clemens. Il se peut en effet qu'à forte dose cette protéine s'avère être toxique. Rien dans ces travaux n'indiquent que le taux de NS-2 soit comparable à celui mesuré lors d'une infection classique.

D'autre part, les cellules que nous avons établies avec un vecteur pZipneo-NS2, montre au contraire une tendance à un meilleur ancrage au support de culture. Le temps nécessaire pour décoller ces cellules avec de la versène trypsine avait considérablement augmenté. Cette surprenante constatation n'est probablement pas un effet direct de NS-2 mais la conséquence d'une perturbation métabolique occasionnée par celle-ci.

9.4. PERSPECTIVES

Le fait, que nous ayons réussi à transduire et exprimer de façon stable ces séquences parvovirales dans des cellules résistantes et sensibles, nous élargit considérablement notre champ d'investigation, il sera désormais possible d'utiliser cet outil dans des systèmes cellulaires difficiles à transfecter afin de déterminer les rôles respectifs des protéines NS-1 et NS-2 aux niveaux cellulaires et moléculaires.

Dans ce but, il serait judicieux de construire un recombinant n'exprimant que la protéine NS-1. Cette construction peut être réalisée en effectuant une ou plusieurs mutations ponctuelles au niveau du site donneur d'épissage (grand intron) empêchant ainsi la genèse de l'ARNm R2 codant pour la protéine NS-2. Ce vecteur NS1+ (exprimant NS-1) permettra d'isoler toutes les fonctions de cette protéine pour les étudier. Il sera alors possible de mettre en évidence une synergie entre les protéines NS-1 et NS-2 en co-infectant les 2 vecteurs NS-1+ et NS-2+ dans une même cellule. L'utilisation de promoteurs modulables forts pourra alors être envisagée.

CONCLUSION GENERALE

Les travaux rapportés ici ont permis de montrer que les parvovirus autonomes MVMP et H-1 étaient dépendants d'événements intracellulaires liés à la transformation maligne pour se répliquer et lyser la cellule en exprimant un facteur cytotoxique.

Ainsi nous avons montré qu'il est possible de faire acquérir la capacité à amplifier l'ADN viral en transformant la cellule normale par un agent cancérigène viral, physique ou chimique. Cette acquisition nouvelle s'accompagne aussi pour les parvovirus MVMP et H-1 (essentiellement spécifiques de cellules de rongeurs) de pouvoir infecter des fibroblastes humains, de les lyser et dans certains cas de produire une nouvelle descendance virale infectieuse. Ces facultés ne sont pas liées à une augmentation de l'internalisation des virions par la membrane cytoplasmique.

Nous avons pu déterminer qu'il existait ainsi dans la cellule normale une ou plusieurs barrières s'opposant au bon déroulement du cycle de réplication de l'ADN parvoviral, l'ADN viral n'est pas amplifié, aucune production virale n'est décelable.

Par ailleurs, étant donné que des cellules transformées non productrices de virus pouvaient être lysées par le parvovirus, d'autres membres de l'équipe (Cornélis et coll. 1988b) montrèrent que cette mort cellulaire pouvait être en rapport avec l'augmentation de synthèse de protéines non-structurales suite à la transformation maligne.

Cette transformation occasionne des modifications moléculaires et cellulaires importantes. Certains gènes cellulaires sont soumis à de nouvelles régulations. Ainsi l'expression de ces gènes s'en trouve modulée positivement ou négativement. Malgré l'apport technique et humain dont nous disposions à l'époque, il ne fut pas possible de mettre en évidence une corrélation entre l'expression de gènes relatifs à la transformation maligne et la sensibilité aux parvovirus autonomes.

Dans une cellule transformée, le parvovirus doit trouver un environnement particulier qui lui permette de se répliquer et de lyser la cellule. C'est pour tenter de déterminer les composantes et activités de ce "milieu favorable" que nous avons construit l'outil "rétrovirus recombiné avec des séquences parvovirales". Les protéines VP n'ayant à priori qu'un rôle d'emballage, nous avons inséré dans ce vecteur la séquence du gène contrôlant la synthèse des protéines non-structurales NS-1 et NS-2.

Nous avons ainsi montré que la cytotoxicité du parvovirus est située au niveau de la seule protéine NS-1, la protéine NS-2 produite seule ne provoque en effet aucune cytotoxicité.

Les cellules obtenues après infection par les particules recombinées expriment les séquences apportées par le vecteur. Il est maintenant possible d'étudier l'impact moléculaire et cellulaire des 2 protéines non-structurales dans n'importe quel système cellulaire et ce de façon stable et constitutive.

D'un point de vue plus global, nous avons apporté des solutions et des énigmes concernant le mécanisme d'action de ces virus au sein d'une cellule.

Il est clair que ce minuscule virus exerce un pouvoir oncolytique dont la spécificité et le mécanisme nous échappe encore. Sa simplicité apparente recèle une complexité à la hauteur de nos ambitions à savoir faire de ce virus à la fois un marqueur d'un ou de plusieurs événements de la transformation cellulaire maligne, et de s'enrichir des connaissances acquises sur le plan de sa spécificité et de son efficacité pour lutter contre les processus de cancérisation.

BIBLIOGRAPHIE

AHN J.K., PITLUCK Z.W. and WARD D.C. (1992).

The GC box and TATA transcription control elements in the P38 promoter of minute virus of mice are necessary and sufficient for trans-activation by the non-structural protein NS-1.

Journal of Virology **66.6**, 3776-3783.

ANDERSON M.J., JONES S.E., FISHER-HOCH S.P., LEWIS E., HALL S.M., BARTLETT C.L.R., COHEN B.J., MORTIMER P.P. and PEREIRA M.S. (1983).

Human parvovirus, the cause of erythema infectiosum (fifth disease)?

Lancet *i*, 1378.

ANDERSON M.J. and PATTISON J.R. (1984).

The human parvovirus.

Archives of virology **82**, 137-148.

ANTONIETTI J.-P., SAHLI R., BEARD P. and HIRT B. (1988).

Characterization of the cell type-specific determinant in the genome of minute virus of mice.

Journal of virology **62**, 552-557.

ARTELT P., GRANNEMAN R., STOCKING C., FRIEL J., BARTSCH J. and HAUSER S. (1991).

The prokaryotic neomycin-resistance-encoding gene acts as a transcriptional silencer in eukaryotic cells.

Gene **99**, 249-254.

ASTELL C.R., CHOW M.B. and WARD D.C. (1985).

Sequence analysis of the termini of virion and replicative forms of minute virus of mice DNA suggests a modified rolling hairpin model for autonomous parvovirus DNA replication.

Journal of virology **54**, 171-177.

ASTELL C.R., THOMSON M., CHOW M.B. and WARD D.C. (1983a).

Structure and replication of minute virus of mice DNA.

Cold spring harbor symposium **47**, 751-762.

ASTELL C.R., THOMSON M., MERCHLINSKY M. and WARD D.C. (1983b).

The complete DNA sequence of minute virus of mice, an autonomous parvovirus.
Nucleic acids research **11**, 999-1018.

**AVALOSSE B., CHEN Y.Q., CORNELIS J.J., DUPONCHEL N., BECQUART P.,
NAMBA N. and ROMMELAERE J. (1987).**

Amplification of parvoviral DNA as a function of host-cell transformation.

In "Accomplishments in oncology: the role of DNA amplification in carcinogenesis". J.B.
Lippincott. Philadelphia. 140-152.

BAER P.N., GARRINGTON G.E. and KILHAM L. (1971).

Effect of age and H-1 virus on healing fractures in hamsters.
Journal of gerontology **26**, 373-377.

BALL-GOODRICH L.J. and TATTERSALL P. (1992).

Two amino acid substitutions within the capsid are coordinately required for acquisition
of fibrotropism by the lymphotropic strain of minute virus of mice.
Journal of virology **66**, 3415-3423.

BAUER H.J. and MONREAL G. (1986).

Herpesviruses provide helper functions for avian adeno-associated parvovirus.
Journal of general virology **67**, 181-185.

**BECQUART P., VANACKER J.-M., DUPONCHEL N., BEGUE A. and ROMMELARE J.
(1993).**

Expression of non-structural proteins of parvovirus MVMP from recombinant
retroviruses: predominant role of the parvoviral NS-1 product in host cell disturbance.
Research in virology. **Soumis.**

BERGS V.V. (1969).

Rat virus-mediated suppression of leukemia induction by Moloney virus in rats.
Cancer research **29**, 1669-1672.

BERNS K.I. (1991).

Parvoviridae and their replication.

Fundamental virology, second edition, (Ed.) B.N. Fields, D.M. Knipe et coll. . Raven Press, Ltd., New York. Ch. **32**, 817-837.

BERNS K.I. and **BOHENZKY R.A.** (1987).

Adeno-associated viruses: an update.

Advances in virus research **32**, 243-306.

BERNS K.I. and **LABOW M.A.** (1987b).

Parvovirus gene regulation.

Journal of general virology **68**, 601-614.

BLACKLOW N.R., **CUKOR G.**, **KIBRICK S.** and **QUINNAN G.** (1978).

Interactions of adeno-associated viruses with cells transformed by herpes simplex virus.

In "Replication of mammalian parvoviruses" (Ward D.C. and Tattersall P., Eds).

Cold spring harbor laboratory, cold spring harbor, New York, 87-98.

BRANDENBURGER A., **LEGENDRE D.**, **AVALOSSE B.** and **ROMMELAERE J.** (1990).

NS-1 and NS-2 proteins may act synergistically in the cytopathogenicity of parvovirus MVMp.

Virology **174**, 576-584.

BROWN K.E. (1989).

What threat is human parvovirus B19 to the foetus? A review.

British journal of obstetrics and gynaecology **96**, 764-767.

BROWN K.E., **MORI J.**, **COHEN B.J.** and **FIELD A.M.** (1991).

In vitro propagation of parvovirus B19 in primary foatal liver culture.

Journal of general virology **72**, 741-745.

CATER J.E. and **PINTEL D.J.** (1992).

The small non-structural protein NS2 of theautonomous parvovirus minute of mice is required for virus growth in murine cells.

Journal of general virology **73**, 1839-1843.

CEPKO C.L., ROBERTS B.E. and MULLIGAN R.C. (1984).

Construction and applications of a highly transmissible murine retrovirus shuttle vector.
Cell **37**, 1053-1062.

CHEN Y.Q., de FORESTA F., HERTOOGHS J., AVALOSSE B., CORNELIS J.J. and ROMMELAERE J. (1986).

Selective killing of simian virus 40-transformed fibroblasts by parvovirus H-1.
Cancer research **46**, 3574-3579.

CHEN Y.Q., TUYNDER M.C., CORNELIS J.J., BOUKAMP P., FUSENING N.E. and ROMMELAERE J. (1989).

Sensitization of human keratinocytes to killing by parvovirus H-1 takes place during their malignant transformation but does not require them to be tumorigenic.
Carcinogenesis **10**, 163-167.

CLEMENS K.E., CERUTIS D.R., BURGER L.R., YANG C.Q. and PINTEL D.J. (1990).

Cloning of minute virus of mice cDNA and preliminary analysis of individual viral proteins expressed in murine cells.
Journal of virology **64**, 3967-3973.

CLEMENS K.E. and PINTEL D.J. (1987).

Minute virus of mice (MVM) mRNAs predominantly polyadenylate at a single site.
Virology **160**, 511-514.

CLEMENS K.E. and PINTEL D.J. (1988).

The two transcription units of the autonomous parvovirus minute virus of mice are transcribed in a temporal order.
Journal of virology **62**, 1448-1451.

CONE R.D., WEBER-BENAROUS A., BAORTO D. and MULLIGAN R.C. (1987).

Regulated expression of a complete human β -globine gene encoded by a transmissible retrovirus vector.
Molecular and cellular biology **7**, 887-897.

CORNELIS J.J., BECQUART P., DUPONCHEL N., SALOME N., AVALOSSE B., NAMBA M. and ROMMELAERE J. (1988a).

Transformation of human fibroblasts by ionising radiation, a chemical carcinogen, or simian virus 40 correlates with an increase in susceptibility to the autonomous parvoviruses H-1 and minute virus of mice.

Journal of virology **62**, 1679-1686.

CORNELIS J.J., SPRUYT N., SPEGELAERE P., GUETTA E., DARAWSHI T., COTMORE S.F., TAL J. and ROMMELAERE J. (1988b).

Sensitization of transformed rat fibroblasts to killing by parvovirus minute virus of mice correlates with an increase in viral gene expression.

Journal of virology **62**, 3438-3444.

COTMORE S.F., NUESCH J.P.F. and TATTERSALL P. (1992).

In vitro excision and replication of 5' telomeres of minute virus of mice DNA from cloned palindromic concatemer functions.

Virology **190**, 365-377.

COTMORE S.F. and TATTERSALL P. (1986).

Organization of non-structural genes of the autonomous parvoviruses.

Journal of virology **58**, 724-732.

COTMORE S.F. and TATTERSALL P. (1987).

The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates.

Advances in virus research **33**, 91-169.

COTMORE S.F. and TATTERSALL P. (1988).

The NS-1 polypeptide of minute virus of mice is covalently attached to the 5' termini of duplex replicative-form DNA and progeny single strands.

Journal of virology **62**, 851-860.

COTMORE S.F. and TATTERSALL P. (1989).

A genome-linked copy of the NS-1 polypeptide is located on the outside of infectious parvovirus particles.

Journal of virology **63**, 3902-3911.

COTMORE S.F. and TATTERSALL P. (1990).

Alternate splicing in a parvoviral non-structural gene links in a common amino-terminal sequence to downstream domains which confer radically different localization and turnover characteristics;

Virology **177**, 477-487.

CUKOR G., BLACKLOW N.R., HOGGAN D. and BERNS K.I. (1984).

Biology of adeno-associated. In "The parvoviruses". (Berns, K.I., Ed.). Plenum press, New York and London, 33-60.

CUKOR G., BLACKLOW N.R., KIBRICK S. and SWAN I.C. (1975).

Effect of adeno-associated virus on cancer expression by herpes virus-transformed hamsters cells.

Journal of national cancer institute **55**, 957-959.

DIXIT M., WEBB M.S., SMART W.C. and OHI S. (1991);

Construction and expression of arecombinant adeno-associated virus that harbors a human β -globine-encoding cDNA.

Gene **104**, 253-257.

DOERIG C., BERNHARD H., ANTONIETTI J.P. and BEARD P. (1990).

Non-structural proteins of parvoviruses B19 and minute virus of mice controls transcription.

Journal of virology **64**, 387-396.

DOERIG C., HIRT B., BEARD P. and ANTONIETTI J.P. (1988).

Minute virus of mice non-structural protein NS-1 is necessary and sufficient for trans-activation of the viral P39 promoter.

Journal of general virology **69**, 2563-2573.

DUPRESSOIR T., VANACKER J.-M., CORNELIS J.J., DUPONCHEL N. and ROMMELAERE J. (1989).

Inhibition by parvovirus H-1 of the formation of tumors in nude mice and colonies in vitro by transformed human mammary epithelial cells.

Cancer research **49**, 3203-3208.

- DZIERZAK E.A., PAPAYANNOPOULOU T. and MULLIGAN R.C. (1988).**
Lineage-specific expression of a human β -globin gene in murine bone marrow transplant recipients reconstituted with retrovirus-transduced stem cells.
Nature **331**, 35-41.
- FADEN H., GARY G.W. and ANDERSON L.J. (1992).**
Chronic parvovirus infection in a presumably immunological healthy woman.
Clinical infectious diseases **15**, 595-597.
- FAISST S., SCHLEHOFER J.R. and ZUR HAUSEN H. (1989).**
Transformation of human cells by oncogenic viruses supports permissiveness for parvovirus H-1 propagation.
Journal of virology **63**, 2152-2158.
- FAUST E.A. and GLOOR G. (1984).**
Characterization of a metastable partially replicated dimeric intermediate of minute virus of mice.
Journal of virology **49**, 621-625.
- GEORG-FRIS B., BIEDERLACK S., WOLF J. and ZUR HAUSEN H. (1984).**
Analysis of proteins, helper dependence and sero-epidemiology of a new human parvovirus.
Virology **134**, 64-71.
- GIRAUD C. and BERGOIN M. (1991).**
Expression of the Junonia coenia densovirus (Jc DNV) genome development of a Jc DNV-derived insect cell expression vector.
4th parvovirus workshop, August 18-22, 1991. Elsinore. Denmark.
- GORMAN C.M., MOFFAT L.F. and HOWARD B.H. (1982).**
Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyl-transferase in mammalian cells.
Molecular and cellular biology **2**, 1044-1051.
- GRAHAM F.L. and van der ERB A.J. (1973).**
Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5.
Virology **52**, 456-457.

GU M., CHEN F. and RHODE S.L. (1992).

Parvovirus H-1 P38 promoter requires the trans-activation region (tar), an SP1 site, and a TATA box for full activity.

Virology **187**, 10-17.

GU M. and RHODE S.L. (1992).

Trans-activation of H-1 parvovirus P38 promoter is correlated with increased binding of cellular protein(s) to the trans-activation-responsive element (tar).

Virology **190**, 116-123.

GUETTA E., GRAZIANI Y. and TAL J. (1986).

Suppression of Ehrlich ascites tumors in mice by minute virus of mice.

Journal of the national cancer institut **76**, 1177-1180.

HARTLEY J.W. and ROWE W.P. (1960).

A new mice virus apparently related to the adenovirus group.

Virology **11**, 645-647.

HERMONAT P.L. and MUZYCZKA N. (1984).

Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells.

Proceedings of the national academy of sciences **81**, 6466-6470.

HIRT B. (1967).

Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cells cultures.

Journal of molecular biology **26**, 365-369.

KATZ E. and CARTER B.J. (1986).

Effect of adeno-associated virus on transformation of NIH 3T3 by ras gene on tumorigenicity of an NIH 3T3 transformed cell line.

Cancer research **36**, 3023-3026.

KIRCHSTEIN R.L., SMITH L.O. and PETERS E.A. (1968).

Inhibition of adenovirus 12 oncogenicity by adeno-associated virus.

Proceedings of the society for experimental biology and medicine **128**, 670-673.

- KIMSEY P.B.**, **ENGERS H.D.**, **HIRT B.** and **JONGENEEL C.V.** (1986).
Pathogenicity of fibroblasts- and lymphocyte-specific variants of minute virus of mice.
Journal of virology **59**, 8-13.
- KOLLECK R.**, **TSENG B.Y.** and **GOULIAN M.** (1981).
Studies on the effect of inhibitors of DNA polymerase on synthesis of parvovirus H-1 DNA.
Journal of supramolecular structure (suppl.) **4**, 332-341.
- KOLLECK R.**, **TSENG B.Y.** and **GOULIAN M.** (1982).
DNA polymerase requirements for parvovirus H-1 DNA replication in vitro.
Journal of virology **41**, 982-991.
- KOTIN R.M.**, **SINISCALCO M.**, **SAMULSKI R.J.**, **ZHU X.**, **HUNTER L.**, **LAUGHLIN C.A.**, **McLAUGHLIN S.**, **MUZYCZKA N.**, **ROCCHI M.** and **BERNS K.I.** (1990).
Site-specific integration by adeno-associated virus.
Proceedings of the national academy of sciences **87**, 2211-2215.
- KURTZMAN G.J.**, **GASCON P.**, **CARAS M.**, **COHEN B.** and **YOUNG N.S.** (1988).
B19 parvovirus replicates in circulating cells of acutely infected patients.
Blood **71**, 1448-1454.
- LABOW M.A.**, **GRAF L.H.** and **BERNS K.I.** (1987).
Adeno-associated virus gene expression inhibits cellular transformation by heterologous genes.
Molecular and cellular biology **7**, 1320-1325.
- LABIENEC-PINTEL L.** and **PINTEL D.** (1986).
The minute virus of mice P39 transcription unit can encode both capsid proteins.
Journal of virology **57**, 1163-1167.
- LEBOWITZ R.M.** and **ROEDER R.G.** (1986).
Parvovirus H-1 expression: mapping of the abundant cytoplasmic transcripts and identification of promoter sites and overlapping transcription units.
Journal of virology **58**, 271-280.



LEDERMAN M., COTMORE S.F., STOUT E.R. and BATES R.C. (1987).

Detection of bovine parvovirus proteins homologous to the non-structural NS-1 proteins of others autonomous parvoviruses.
Journal of virology **61**, 3612-3616.

LEDINKO N., HOPKINS S. and TOOLAN H. (1969).

Relationship between potentiation of H-1 growth of SV40-transformed cells from human diploid MRC-5 fibroblasts.
Journal of general virology **5**, 19-31.

LEGENDRE D. and ROMMELAERE J. (1992).

Terminal regions of the NS-1 protein of the parvovirus minute virus of mice are involved in cytotoxicity and promoter trans-inhibition.
Journal of virology **66**, 5705-5713.

LEGRAND C., MOUSSET S., SALOME N. and ROMMELAERE J. (1992).

Cooperation of oncogenes in cell transformation and sensitization to killing by the parvovirus minute virus of mice.
Journal of general virology **73**, 2003-2009.

LI X. and RHODE S.L. (1991).

Non-structural protein NS-2 of parvovirus H-1 is required for efficient viral protein synthesis and virus production in rat cells in vivo and in vitro.
Virology **184**, 117-130.

LINSER B., BRUNING H. and ARMENTROUT R.W. (1977).

Specific binding sites for a parvovirus, minute virus of mice, on cultured mouse cells.
Journal of virology **24**, 211-221.

McLACHLIN J.R., CORNETTA K., EGLITIS M.A. and ANDERSON W.F. (1990).

Retroviral-mediated gene transfer.
In "Progress in nucleic acid research and molecular biology" **38**, 91-135.

McLAUGHLIN S.K., COLLIS P., HERMONAT P.L. and MUZYCZKA N. (1988).

Adeno-associated virus general transduction vectors: analysis of proviral structures.
Journal of virology **62**, 1963-1973.

McMASTER G.K., BEARD P., ENGERS H.D. and HIRT B. (1981).

Characterization of an immunosuppressive parvovirus related to the minute virus of mice.

Journal of virology **38**, 317-326.

MANIATIS T., SAMBROOK J. and FRITSCH E.F. (1989).

Molecular cloning. A laboratory manual.

Second edition. Cold spring harbor laboratory press 1989.

MANN R., MULLIGAN R.C. and BALTIMORE D.B. (1983).

Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus.

Cell **33**, 153-159.

MATTHEWS R.E.F. (1982).

Classification and nomenclature of viruses.

Intervirology **17**, 72-75.

MAYOR H.D., DRAKE S., STAHOMANN J. and MUMFORD D.M. (1976).

American journal of obstetrics and gynaecology **126**,100.

MAYOR H.D., HOULDITCH G.S. and MUMFORD D.M. (1973).

Influence of adeno-associated satellite virus on adenovirus-induced tumors in hamsters.

Nature new biology **241**, 44-46.

de la MAZA L.M. and CARTER B.J. (1981).

Inhibition of adenovirus oncogenicity in hamster by adeno-associated virus DNA.

Journal of national cancer institute **67**, 1323-1326.

MENDELSON E., SMITH M.G. and CARTER B.J. (1988).

Expression and rescue of a non selected marker from an integrated AAV vector.

Virology **166**, 154-165.

MERCHLINSKY M.J., TATTERSALL P.J., LEARY J.J., COTMORE S.F., GARDINER E.M. and WARD D.C. (1983).

Construction of an infectious molecular clone of the autonomous parvovirus minute virus of mice.

Journal of virology **47**, 227-232.

MILLER A.D. and ROSMAN G.J. (1989).

Improved retroviral vectors for gene transfer and expression.

Biotechniques **7**, 980-985.

MORGAN W.R. and WARD D.C. (1986).

Three splicing patterns are used to excise the small intron common to all minute virus of mice RNA.

Journal of virology **60**, 1170-1174.

MORINET F. (1987).

Les parvovirus humains.

Annales de pédiatrie **34**, 547-550.

MORTIMER P.P., HUMPHRIES R.K., MOORE J.G., PURCELL R.H. and YOUNG N.S. (1983).

A human parvovirus-like virus inhibits haematopoietic colony formation in vitro.

Nature **302**, 426-429.

MOUSSET S., CORNELIS J., SPRUYT N. and ROMMELAERE J. (1986).

Transformation of established murine fibroblasts with an activated cellular Harvey-ras oncogene or the polyoma virus middle T gene increases cell permissiveness to parvovirus minute virus of mice.

Biochimie **68**, 951-955.

MOUSSET S. and ROMMELAERE J. (1982).

Minute virus of mice inhibits cell transformation by simian virus 40.

Nature **300**, 537-539.

MOUSSET S. and ROMMELAERE J. (1988).

Susceptibility to parvovirus minute virus of mice as a function of the degree of host cell transformation: little effect of simian virus 40 infection and phorbol ester treatment.
Virus research **9**, 107-117.

MUNSHI N.C., ZHOU S., WOODY M.J., MORGAN D.A. and SRIVASTAVA A. (1993).

Successful replication of parvovirus B19 in the human megakaryotic leukemia cell line MB-02.
Journal of virology **67**, 562-566.

NAEGER L.K., CATER J. and PINTEL D.J. (1990).

The small non-structural protein (NS2) of the parvovirus minute virus of mice is required for efficient DNA replication and infectious virus production in a cell-type-specific manner.
Journal of virology **64**, 6166-6175.

OHI S., DIXIT M., KELLY TILLERY M. and PLONG S.G. (1990).

Construction and replication of an adeno-associated virus expression vector that contains human β -globin cDNA.
Gene **89**, 279-282.

OSTROVE J.M., DUCKWORTH D.H. and BERNS K.I. (1981).

Inhibition of adeno-transformed cell oncogenicity by adeno-associated virus.
Virology **113**, 521-533.

PATTISON J.R. (1989).

The medical significance of human parvoviruses.
EMBO parvovirus workshop, Ma'ale Hachamisha (Israel).

PATTISON J.R., JONES S.E., HODGSON J., DAVIS L.R., WHITE J.M., STROUD C.E. and MURTARA L. (1981).

Parvovirus infections and hypoplastic crisis in sickle cell anaemia.
Lancet **i**, 664-665.

PORTER H.J., QUANTRILL A.M. and FLEMING K.A. (1988).

B19 parvovirus infection of myocardial cells.
Lancet **1**, 535-536.

RHODE S.L. (1978).

H-1 DNA synthesis. In "Replication of mammalian parvoviruses" D.C. Ward and P. Tattersall (ed.). Cold spring harbor laboratory, Cold spring harbor, New York. 279-296.

RHODE S.L. and KLAASSEN B. (1982).

DNA sequence of the 5' termini containing the replication origin of parvovirus replicative form DNA.

Journal of virology **41**, 990-999.

RHODE S.L. and PARADISO P.R. (1983).

Parvovirus genome: nucleotide sequence of H-1 and mapping of its genes by hybrid-arrested translation.

Journal of virology **45**, 173-184.

RHODE S.L. and RICHARD S.M. (1987).

Characterization of the trans-activation-responsive element of the parvovirus H-1 P38 promoter.

Journal of virology **61**, 2807-2815.

RIGBY P.W.J., DIECKMANN M., RHODES C. and BERG P. (1977).

Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I.

Journal of molecular biology **113**, 237-251.

RITTNER K., HEILBROON R., KLEINSCHMIDT J.A. and SCZAKIEL G. (1992).

Adeno-associated virus type 2-mediated inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication: involvement of p78^{rep}/p68^{rep} and the HIV-1 long terminal repeat.

Journal of general virology **73**, 2977-2981.

ROMMELAERE J. (1990).

Action anticancéreuse des parvovirus.

Médecine/sciences **6**, 534-543.

ROMMELAERE J. and TATTERSALL P. (1988).

Oncosuppression by parvoviruses. In Tijssen, P. (ed.), Parvovirus Handbook. CRC, Boca Raton.

ROMMELAERE J. and WARD D.C. (1982).

Effect of UV-radiation on DNA replication of the parvovirus minute virus of mice in mouse fibroblasts.

Nucleic acid research **10**, 2577-2596.

RUFFOLO P., MARGOLIS G. and KILHAM L. (1966).

The induction of hepatitis by prior partial hepatectomy in resistant adult rats injected with H-1 virus.

American journal of pathology **49**, 795-824.

SALOME N., VAN HILLE B., DUPONCHEL N., MENEGUZZI G., CUZIN F., ROMMELAERE J. and CORNELIS J.J. (1990).

Sensitization of transformed rat cells to parvovirus MVMP is restricted to specific oncogenes.

Oncogene **5**, 123-130.

SALOME N., VAN HILLE B., GEUSKENS M. and ROMMELAERE J. (1989).

Partial reversion of conditional transformation correlates with a decrease in the sensitivity of rat cells to killing by the parvovirus minute virus of mice but not in their capacity for virid production: effect of a temperature-sensitive v-src oncogene.

Journal of virology **63**, 4794-4807.

SAMULSKI R.J., ZHU X., XIAX X., BROOK J.D., HOUSMAN D.E., EPSTEIN N. and HUNTER L.A. (1991).

Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19.

Embo journal **10**, 3941-3950.

SCHLEHOFER J.R., EHRBAR M. and ZUR HAUSEN H. (1986).

Vaccinia virus, herpes simplex virus and carcinogens induce DNA amplification in a human cell line and support replication of a helper dependent parvovirus.

Virology **152**, 110-117.

SCHUTZBANK T., ROBINSON R., OREN M. and LEVINE A.J. (1982).

SV40 large tumor antigen can regulate some cellular transcripts in a positive fashion.
Cell **30**, 481-490.

SIEGL G. (1976).

The parvoviruses.

in Gard S., Hallauer C., eds. Virology monographs. New York: Springer-Verlag. 4-109.

SIEGL G. (1984).

Biology and pathogenicity of autonomous parvoviruses.

In "Parvoviruses" (Berns K.I. Ed.), Plenum Press, New York and London. 297-362.

SINGER I.I. and RHODE S.L. (1978).

Electron microscopy and cytochemistry of H-1 parvovirus intracellular morphogenesis.

In "Replication of mammalian parvoviruses". Cold spring harbor laboratory, New York.
479-504.

SPEGELAERE P., VAN HILLE B., SPRUYT N., FAISST S., CORNELIS J.J. and ROMMELAERE J. (1991).

Initiation of transcription from the minute virus of mice P4 promoter is stimulated in rat cells expressing a c-Ha-ras oncogene.

Journal of virology **65**, 4919-4928.

SOUTHERN E.M. (1975).

Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.

Journal of molecular biology **98**, 503-517.

TATTERSALL P. and BRATON J. (1983).

Reciprocal productive and restrictive virus-cell interactions of immunosuppressive and prototype strains of minute virus of mice.

Journal of virology **46**, 944-955.

TATTERSALL P., CAWTE P.J., SHATKIN A.J. and WARD D.C. (1976a).

Three structural polypeptides coded for by minute virus of mice, a parvovirus.

Journal of virology **20**, 273-289.

TATTERSALL P. and **WARD D.C.** (1976b).

Rolling hairpin model for replication of parvovirus and linear chromosomal DNA.
Nature **263**, 106-109.

TATTERSALL P. and **WARD D.C.** (1978).

The parvoviruses - An introduction. In "Replication of mammalian parvoviruses". (D.C. WARD and P. Tattersall Eds.) Cold spring harbor laboratory. New York. 3-12.

TOOLAN H. (1960).

Experimental production of mongoloid hamsters.
Science **131**, 1446-1448.

TOOLAN H. (1967).

Lack of oncogenic effect of the H-viruses for hamsters.
Nature **208**, 812-813.

TOOLAN H. and **LEDINKO N.** (1965).

Growth and cytopathogenicity of H-viruses in human and simian cell cultures.
Nature **208**, 812-813.

TOOLAN H. and **LEDINKO N.** (1968).

Inhibition of H-1 virus of the incidence of tumors produced by adenovirus 12 in hamsters.
Virology **35**, 475-478.

TOOLAN H., **RHODE S.L.** and **GIERTHY J.F.** (1982).

Inhibition of 7,12-dimethyl(a)anthracene-induced tumors in Syrian hamsters by prior infection with H-1 parvovirus.
Cancer research **42**, 2552-2555.

TRATSCHIN J.-D., **WEST M.H.P.**, **SANDBANK T.** and **CARTER B.J.** (1984).

A human parvovirus, adeno-associated virus, as a eucaryotic vector: expression and encapsidation of the procaryotic gene for chloramphenicol acetyltransferase.
Molecular and cellular biology **4**, 2072-2081.

TSAO J., CHAPMAN M.S., AGBANDGE M., KELLER W., SMITH K., WU H., LUO M., SMITH T.J., ROOSMANN M.G., COMPANS R.W. and PARRISH C.R. (1991).
The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications.
Nature **251**, 1456-1464.

TULLIS G.E., BURGER L.R. and PINTEL D.J. (1993).
The minor capsid protein VP1 of the autonomous parvovirus minute virus of mice is dispensable for encapsidation of progeny single-stranded DNA but is required for infectivity.
Journal of virology **67**, 131-141.

WALTER S., RICHARDS R. and ARMENTROUT J.R. (1980).
Cell cycle-dependent replication of the DNA of minute virus of mice, a parvovirus.
Biochemical and biophysical acta **607**, 420-431.

WALTZ C. and SCHLEHOFER J.R. (1992a).
Modification of some biological properties of HeLa cells containing adeno-associated virus DNA integrated into chromosome 17.
Journal of virology **66**, 2990-3002.

WALTZ C., SCHLEHOFER J.R., FLENTJE M., RUDAT V. and ZUR HAUSEN H. (1992b).
Adeno-associated virus sensitizes HeLa cells tumors to γ -rays;
Journal of virology **66**, 5651-5657.

WARD D.C. and TATTERSALL P. (1982).
Minute virus of mice. In "The mouse in biomedical research, vol. II". (H.L. Foster, J.D. Small and J.G. Fox, Eds.) Academic press. Ch **15**, 313-334.

WEST M.H.P., TREMPE J.P., TRASCHIN J.-D. and CARTER B.J. (1987).
Gene expression in adeno-associated virus vector: the effects of chimeric mRNA structure, helper virus, and adenovirus VA RNA.
Virology **160**, 38-47.

WEINDLER and **HEILBRONN** (1991).

A subset of herpes simplex virus replication genes provide helper functions for productive adeno-associated virus replication.

Journal of virology **61**, 2476-2483.

WINOCOUR E. and **KESHET I.** (1980).

Indiscriminate recombination in simian virus 40-infected monkey cell.

Proceeding of the national academy of science USA **77**, 4861-4865.

YAKOBSON B., **KOCH T.** and **WINICOUR E.** (1987).

Replication of adeno-associated virus in synchronized cells without the addition of a helper virus.

Journal of virology **61**, 972-981.

YALKINOGLU A.O., **HEILBRONN R.**, **BÜRKLE A.**, **SCHLEHOFER J.R.** and **ZUR HAUSEN H.** (1988).

DNA amplification of adeno-associated virus as a response to cellular genotoxic stress.

Cancer research **48**, 3123-3129.

YANG T.J. (1987).

Parvoviral-induced regression of canine transmissible venereal sarcoma.

American journal of veterinary research **48**, 799-800.

ANNEXE

**Transformation of Human Fibroblasts by Ionizing Radiation,
a Chemical Carcinogen, or Simian Virus 40 Correlates with
an Increase in Susceptibility to the Autonomous Parvoviruses
H-1 Virus and Minute Virus of Mice**

JAN J. CORNELIS, PAUL BECQUART, NADINE DUPONCHEL,
NATHALIE SALOME, BERNARD L. AVALOSSE, MASAYOSHI NAMBA,
and JEAN ROMMELAERE

Journal of Virology, Vol. 62, p. 1679-1686.

Transformation of Human Fibroblasts by Ionizing Radiation, a Chemical Carcinogen, or Simian Virus 40 Correlates with an Increase in Susceptibility to the Autonomous Parvoviruses H-1 Virus and Minute Virus of Mice

JAN J. CORNELIS,^{1,2*} PAUL BECQUART,¹ NADINE DUPONCHEL,¹ NATHALIE SALOMÉ,¹
 BERNARD L. AVALOSSE,² MASAYOSHI NAMBA,³ AND JEAN ROMMELAERE^{1,2}

Laboratory of Molecular Oncology, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U 186 and Centre National de la Recherche Scientifique UA 041160, Institut Pasteur de Lille, 59019 Lille Cédex, France^{1*}; Laboratory of Biophysics and Radiobiology, Université Libre de Bruxelles, Rhode-St-Genèse, Belgium²; and Department of Pathology, Kawasaki Medical School, Kurashiki, Japan³

Received 9 November 1987/Accepted 2 February 1988

Morphologically altered and established human fibroblasts, obtained either by ⁶⁰Co gamma irradiation, treatment with the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide, or simian virus 40 (SV40) infection, were compared with their normal finite-life parental strains for susceptibility to the autonomous parvoviruses H-1 virus and the prototype strain of minute virus of mice (MVMP). All transformed cells suffered greater virus-induced killing than their untransformed progenitors. The cytotoxic effect of H-1 virus was more severe than that of MVMP. Moreover, the level of viral DNA replication was much (10- to 85-fold) enhanced in the transformants compared with their untransformed parent cells. Thus, in this system, cell transformation appears to correlate with an increase in both DNA amplification and cytotoxicity of the parvoviruses. However, the accumulation of parvovirus DNA in the transformants was not always accompanied by the production of infectious virus. Like *in vitro*-transformed fibroblasts, a fibrosarcoma-derived cell line was sensitive to the killing effect of both H-1 virus and MVMP and amplified viral DNA to high extents. The results indicate that oncogenic transformation can be included among cellular states which modulate permissiveness to parvoviruses under defined growth conditions.

Parvoviruses are small lytic single-stranded DNA viruses which rely heavily on host cell functions for their replication (41). The parvovirus family comprises three groups: the densovirus, which infect insects, and the two more closely related groups of autonomous parvoviruses and adeno-associated viruses which have been found to parasitize birds and mammals, including man (1, 41). Helper functions for growth of adeno-associated viruses are conventionally provided by adenoviruses or members of the herpesvirus family (7). On the other hand, replication of autonomous parvoviruses (34) and, to some extent also, of adeno-associated viruses under specific stress conditions (11, 45) can take place in the absence of helper viruses in certain cell types. The cellular factors which allow the autonomous growth of parvoviruses are unknown. However, there is evidence that the expression of at least some of these factors is not constitutive but is modulated by the physiological state of cells. Function(s) restricted to the S phase of the cell cycle are necessary but not sufficient for virus replication (38, 43). In addition, cell permissiveness to parvoviruses appears to vary as a function of differentiation (37).

Interestingly, a series of transformed cells were also found to differ from their normal parents with respect to their susceptibility to parvoviruses. Thus, permanent lines of mouse and rat fibroblasts transformed by either simian virus 40 (SV40), the polyomavirus middle T gene, or the activated human Harvey *ras*-1 gene were significantly more sensitive to the lytic effect of the prototype strain of minute virus of mice (MVMP) than were their respective untransformed

progenitors (19). This sensitization of transformants was accompanied by their enhanced capacity for viral DNA amplification and is likely to account for the ability of MVMP to inhibit *in vitro* transformation of mouse cells by SV40 (20). Parvoviruses are known to have an affinity for tumors and to antagonize oncogenesis occurring either spontaneously or upon treatment with viral or chemical carcinogens in laboratory animals (for a review, see J. Rommelaere and P. Tattersall, *in P. Tijssen (ed.), Handbook of Parvoviruses*, in press). The way by which the dependence of parvoviruses on conditional cellular functions contributes to such onco-suppression remains to be determined.

A choice system for studying the effect of transformation on cell permissiveness to rodent parvoviruses consists of human fibroblasts. The interaction of normal, finite-life human fibroblasts and rodent parvoviruses results in an infection which is defined as abortive (6) and is characterized by the expression of viral gene products with little viral DNA replication and without concomitant virus production. Thus, normal human fibroblasts are naturally quite resistant to the cytopathic effects of parvoviruses MVMP and H-1 virus. It was recently shown that SV40-transformed human skin fibroblasts were more permissive and sensitive to H-1 virus infection than were their normal untransformed progenitors (4). SV40 failed to provide direct helper functions for parvovirus replication (20a). However, SV40 is a strong pleiotropic transforming agent which activates cellular genes (33), raising the question whether the hypersensitivity of transformed human fibroblasts to parvoviruses is specific for SV40 transformants or is also conferred by other carcinogens. This question was addressed in the present paper by

* Corresponding author.

determining whether sensitization to MVMP or H-1 virus is a general property shared by human fibroblasts which were either transformed *in vitro* by ionizing radiation or a chemical carcinogen or derived from a fibrosarcoma.

Another open issue concerns the effect of cell transformation on the ongoing parvoviral life cycle. SV40 transformation of human fibroblasts was found to convert an abortive type of infection into a productive type. We were thus interested in determining whether human fibroblasts sensitized to H-1 virus or MVMP, as a result of their transformation by other oncogenes, also acquired the ability to release a burst of infectious virus. Were this not the case, it would confine events causing the death of infected cells to a window of the parvovirus life cycle. We report here that transformed human fibroblasts of different origins are all significantly more sensitive to H-1 virus and MVMP than are their respective untransformed progenitors. This sensitization parallels an increase in the permissiveness of transformants to the parvoviruses, although it does not necessarily culminate in the assembly of infectious progeny virus.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and culture. Finite-life human fibroblast strains of lung (MRC-5, WI38) or whole embryo (KMS-6) origin were used as untransformed control cells at passages 24 to 34 (MRC-5, WI38) or 14 to 20 (KMS-6). Transformants with infinite life spans were derived from these strains after SV40 infection (MRC-5V1) (12) or ^{60}Co gamma irradiation (WI38CT-1, KMST-6) (23, 24). The established transformant SUSM-1 had been obtained by treatment of human embryo liver fibroblasts with 4-nitroquinoline 1-oxide (22). HT1080 is a cell line established from a human fibrosarcoma (15). MRC-5, WI38, and HT1080 have been obtained from the American Type Culture Collection via Flow Laboratories. The MRC-5V1 cells were kindly provided by A. R. Lehmann, Brighton, United Kingdom. The cells were routinely grown as monolayers in Eagle minimal essential medium supplemented with nonessential amino acids and 10% fetal calf serum. A9, a line of mouse fibroblasts, and NB-E, a line of SV40-transformed human kidney cells, were grown in Eagle minimal essential medium containing 5% fetal calf serum.

Viruses and plasmids. H-1 virus and MVMP were propagated in NB-E and A9 cells, respectively. Virus was purified according to the method of Tattersall et al. (40). ^3H - and ^{32}P -labeled virus was obtained by incubating infected cells with [*methyl*- ^3H]thymidine (80 Ci/mMol; 25 $\mu\text{Ci/ml}$) and carrier-free $^{32}\text{P}_i$ (0.1 mCi/ml) as described by Rhode (27) and Rommelaere and Ward (30), respectively. Conditions for cell infection and virus harvest have been described previously (5). Titers of H-1 virus and MVMP were determined by plaque assays on NB-E and A9 cells, respectively. pMM984A, a pBR322-based recombinant plasmid containing the entire genome of MVMP (17), was kindly provided by D. C. Ward, New Haven, Conn.

Virus uptake. Virus binding and uptake were determined according to the method of Linser et al. (14) with slight modifications (4). Briefly, cells were inoculated with ^3H -labeled virus for 60 min at 37°C. The inoculum was removed, and the cultures were further incubated for 1 h in complete medium. Cultures were then rinsed with phosphate-buffered saline deprived of Ca^{2+} and Mg^{2+} and incubated for 10 min in phosphate-buffered saline containing 10^{-3} M EDTA. The radioactivity associated with cells and that associated with pooled residual inoculum, medium, and washes were mea-

sured separately. The virus uptake was expressed as the fraction of total radioactivity which segregated with cells after EDTA treatment.

Parvovirus DNA replication. Total intracellular viral DNA synthesis was quantified either in dispersed cell lysates (44) or in blots of viral DNA isolated according to a modified Hirt procedure (16), fractionated by electrophoresis in 1% agarose gels (20 V; 18 h), and transferred to nitrocellulose filters (36). For blots, inoculated virus had tritium-labeled DNA to allow count matching of samples loaded on the gels. Viral DNA was quantitated by hybridization to pMM984A DNA labeled with [α - ^{32}P]dCTP by nick translation (specific activity, 3×10^8 cpm/ μg of DNA) according to the method of Rigby et al. (29). The same probe was used to detect both H-1 virus and MVMP DNA because the genomes of these viruses display over 70% sequence homology (26). Hybridized filters of dispersed cell assays were quantitated by scintillation spectrometry, and those of blots were revealed by autoradiography at -70°C .

The conversion of parental single-stranded (SS) viral DNA to double-stranded monomeric and oligomeric replicative forms was monitored in cells inoculated with ^{32}P -labeled MVMP (30). Parentally labeled DNA was Hirt extracted and fractionated through 1% nondenaturing agarose gels as described above. Bands were localized in dried gels by autoradiography and quantitated by densitometry. Newly synthesized viral DNA was monitored by adding ^{32}P -labeled P_i to previously infected cultures in phosphate-poor medium as described by Rommelaere and Ward (30).

Virus production. H-1 virus or MVMP was inoculated to cultures (2×10^5 cells) at multiplicities of infection (MOIs) ranging from 10^{-2} to 10^1 PFU per cell. Cultures were further incubated in medium and frozen at intervals. The capacity of the cultures to produce infectious virus was calculated from the 2- and 120-h postinfection (p.i.) titers for the MOI of 10^{-1} PFU per cell.

Plating efficiency on plastic and cell viability. The ability of infected cells to produce colonies on plastic petri dishes was determined as described previously (19). In short, cultures (2×10^5 cells) were infected at various MOIs. At 3 to 4 h p.i., the cells were harvested by trypsinization, plated at low densities (10^2 to 10^3 cells per 60-mm dish), and further incubated in complete medium for 10 to 20 days. Colonies were fixed in methanol-acetic acid (3:1, vol/vol), stained with Giemsa, and counted. The killing effect of the parvoviruses was also determined by counting the fraction of infected cells taking up trypan blue.

RESULTS

Description of cell lines. Normal and transformed human fibroblasts, including three closely related pairs, were compared for their sensitivity to the killing effect of parvoviruses MVMP and H-1 virus and for their ability to sustain viral DNA and infectious-particle production. Transformants were either induced *in vitro* by gamma radiation (from a ^{60}Co source), the chemical carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide, or a tumor virus (SV40), or derived from a fibrosarcoma (Table 1). NB-E and A9 cells, routinely used to produce H-1 virus and MVMP, respectively, were analyzed in parallel as references. Transformed human cell lines were distinguishable from their normal progenitors by an extended life span and increased plating efficiency, i.e., a greater ability to form colonies when seeded at low densities on a plastic substrate (Table 1). Moreover, transformed cells had reduced serum requirements for growth, achieved higher saturation densi-

TABLE 1. Growth properties and H-1 virus susceptibilities of human fibroblast lines^a

Cell line	Origin	Transforming agent	Establishment ^b	Uninfected cell plating efficiency ^c (%)	Infected cell viability ^d (%)	Virus uptake ^e (%)	Amplification ^f	
							Viral DNA	Infectious virus
KMS-6	Whole embryo		-	2	75	33	16	0.3
KMST-6	Whole embryo	Gamma rays	+	15	7	38	1,330	0.2
WI38	Embryonic lung		-	1	90	18	14	0.25
WI38CT-1	Embryonic lung	Gamma rays	+	11	20	37	190	14.5
SUSM-1	Embryonic liver	4-NQO ^g	+	18	22	38	335	305
MRC-5	Embryonic lung		-	2	68	44	28	0.5
MRC-5V1	Embryonic lung	SV40	+	38	2	50	1,850	20
HT1080	Fibrosarcoma		+	22.5	5	38	635	50
NB-E	Embryonic kidney	SV40	+	60	1	35	2,160	550

^a Average values from 2 to 3 experiments; less than 25% standard deviation.

^b +, Established, -, nonestablished.

^c Percentage of cells able to form colonies on plastic within 3 weeks after seeding.

^d Percentage of living cells as measured 5 days p.i. (MOI = 10).

^e Percentage of internalized (EDTA elution-resistant) virus.

^f Ratio of viral DNA contents per culture at 30 h versus 2 h p.i. (MOI = 10⁻¹), as determined by dispersed cell assays, and ratio of infectious virus per culture at 120 h versus 2 h p.i. (MOI = 10⁻¹).

^g 4-NQO, 4-Nitroquinoline 1-oxide.

ties, and displayed alterations in both their morphology and karyotypes (22-24). In contrast with normal parental cells, the transformants were capable of anchorage-independent growth, although their cloning efficiency in soft agar remained low (10⁻² to 1%) (22-24) except for NB-E cells (5.3%). Normal fibroblasts grew at similar rates to those of their transformed derivatives (WI38 versus WI38CT-1 and KMS-6 versus KMST-6) (22-24) or even slightly faster (MRC-5 versus MRC-5V1) (12). Population doubling times ranged from 24 to 33 h.

Cell susceptibility to virus infection. The killing effect of H-1 virus and MVMP on the various cells was first determined by counting the fraction of dead cells at intervals p.i. The day 5 p.i. data are given as the most significant in Tables 1 and 2 and indicate that infection of human fibroblasts with either parvovirus results in a reduction of the fraction of living cells in the culture. Moreover, transformed fibroblasts appear to suffer this viral toxic effect to a greater extent than corresponding normal cells. This method does not allow one to quantitate viral cytopathogenicity because of the multiplication of resistant cells and the disintegration of dead cells. Therefore, virus-induced killing was also determined by measuring the residual ability of infected cells to form colonies on plastic substrate. This assay confirmed both the toxicity of H-1 virus and MVMP for normal human fibroblasts and the greater susceptibility of transformed cells to this effect (Fig. 1). The transformants MRC-5V1, KMST-6, and WI38CT-1 were 75 to 1,150 times more sensitive to the lytic action of H-1 virus than their untransformed progenitors at an MOI of 20 PFU per cell (Fig. 1a). Similarly, the chemically transformed and fibrosarcoma-derived lines SUSM-1 and HT1080 were hypersensitive to H-1 virus (Fig. 1a). MVMP also reduced the cloning efficiency of transformed fibroblasts to a greater extent than that of normal cells. Yet MVMP was less cytotoxic than H-1 virus for all human fibroblasts tested, whether normal or transformed (Fig. 1; Tables 1 and 2).

Virus uptake. Data presented in Tables 1 and 2 clearly show that the transformation-associated sensitization of human fibroblasts to H-1 and MVMP cannot merely be ascribed to their greater virus uptake compared with normal cells. No consistent relationship was observed between the amount of internalized virus and the degree of cell sensitivity. Only WI38 cells took up significantly less ³H-labeled

virus than the other cells. Similarly, the amounts of cell-associated viral DNA detected at 2 h p.i. by dispersed cell assays were not significantly different between untransformed and transformed cells (data not shown). Thus, cell-dependent restrictions to virus uptake, which often determine cell susceptibility to various viruses, do not appear to play a major role in the system studied.

Viral DNA synthesis. Parvovirus DNA synthesis can schematically be divided in three stages: (i) the conversion of SS viral DNA to a double-stranded monomer-length replicative form (RF1); (ii) the amplification of RF1 by a process which is accompanied with the formation of multimeric molecules such as a dimer-length replicative form (RF2); and (iii) the synthesis of SS, progeny viral DNA (6, 41).

The fraction of input parvovirus SS DNA which is converted to RF molecules is rather low but can easily be demonstrated for MVMP infecting permissive mouse A9 cells (30). One should bear in mind that MVMP parental DNA conversion may be masked by the spontaneous reannealing of input viral strands. Indeed, MVMP virion stocks comprise a small fraction (on the order of 1%) of particles containing plus strands which can reanneal with major negative strands in infected cells or their lysates, thereby setting a lower limit to the amount of converted parental RF which can be detected (3). When the fate of ³²P-labeled MVMP DNA was analyzed in human fibroblasts, a small fraction of input DNA was found to migrate at the RF1 position for all cells tested. However, in contrast with the situation in A9 cells, parentally labeled RF DNA did not accumulate in human cells with time p.i. and did not comprise a measurable fraction of molecules with covalently bound viral and complementary strands (data not shown). Therefore, it appears that MVMP DNA conversion in both normal and transformed human fibroblasts was too low to be distinguished from spontaneous strand reannealing, thereby preventing us from comparing both types of cells for their proficiency in this process.

However, a striking difference was observed between normal and transformed cells when total parvovirus DNA synthesis was measured by dispersed cell assays (Fig. 2; Tables 1 and 2). All tested lines had similar viral DNA contents at 2 h p.i., confirming that they do not differ significantly in their virus uptake efficiencies (data not shown). In contrast, the various cells could be distinguished

TABLE 2. Characteristics of MVMP infection of human fibroblasts^a

Cell line	Cell viability (%)	Virus uptake (%)	Amplification	
			Viral DNA	Infectious virus
KMS-6	90	46	15	0.1
KMST-6	40	40	340	2.5
WI38	91	24	1	0.3
WI38CT-1	75	37	10	2.0
SUSM-1	77	39	25	14.5
MRC-5	85	45	2	0.15
MRC-5V1	53	43	20	18.5
HT1080	35	45	725	17.0
A9	40	38	1,750	10 ^d

^a Experimental conditions and definitions are the same as for Table 1.

by the amount of viral DNA accumulated during p.i. incubation. The parvovirus DNA content of the cultures at 30 h p.i. increased with the MOI up to a plateau, giving their maximal capacity for viral DNA synthesis (Fig. 2). All transformants had a greater H-1 virus and MVMP DNA capacity than normal cells, although there was a considerable variation between lines. The extent of viral DNA synthesis was greater for H-1 virus than for MVMP in all human fibroblasts studied, with the exception of HT1080. The amplification of input parvovirus DNA achieved by cells infected at an MOI of 10⁻¹ PFU per cell (within the linear part of the dose-response curve; Fig. 2) is given in Tables 1 and 2. The comparison of related pairs of cells indicates that the factor of parvovirus DNA amplification was 14- to 85-fold (H-1 virus) and 10- to 23-fold (MVMP) higher in the transformants than in their normal progenitors. As a whole, the proficiency of transformed human fibroblasts in the

amplification of H-1 virus or MVMP DNA can be put together with their hypersensitivity to the lytic effect of these viruses, although no strict correlation was found between the levels of both parameters (compare Fig. 1 and 2).

To determine whether the viral DNA replicative intermediates present in fully permissive mouse A9 cells were also produced in human fibroblasts, total MVM DNA extracted from infected cultures was blot hybridized after fractionation by agarose gel electrophoresis (Fig. 3). RF DNA could hardly be detected in normal cells which essentially contained SS DNA of probable input origin (Fig. 3, lanes 3 to 4 and 7 to 8). In contrast, transformed and tumor-derived human fibroblasts sustained a clear-cut production of MVMP RF1 and RF2 intermediates (Fig. 3, lanes 5 to 6, 9 to 12 and 15 to 17). Similar results were obtained for H-1 virus-infected cells (4; data not shown). Mouse A9 cells accumulated MVMP progeny SS DNA in addition to RF molecules (Fig. 3, lanes 1 to 2). Such a MVMP progeny strand synthesis could not be demonstrated by this method in the transformed fibroblasts under study. As exemplified in Fig. 3 for HT1080 cells, total SS MVM DNA did not amplify with p.i. time and may thus consist mostly of input strands (Fig. 3, compare lanes 13 and 14 with 15 and 17).

That human cell transformants may exhibit some deficiency to accumulate SS progeny DNA despite high levels of total viral amplification was confirmed by growing MVMP or H-1 virus-infected cells in the presence of ³²P-labeled P_i. Transformed cultures achieved little or no detectable de novo synthesis of parvovirus SS DNA while accumulating RF molecules. This is illustrated by Fig. 4, showing that newly synthesized viral DNA present in mouse A9 and human NB-E cells consists of SS, the recently described 8.0-kilobase intermediate (9), RF1, and RF2, whereas only

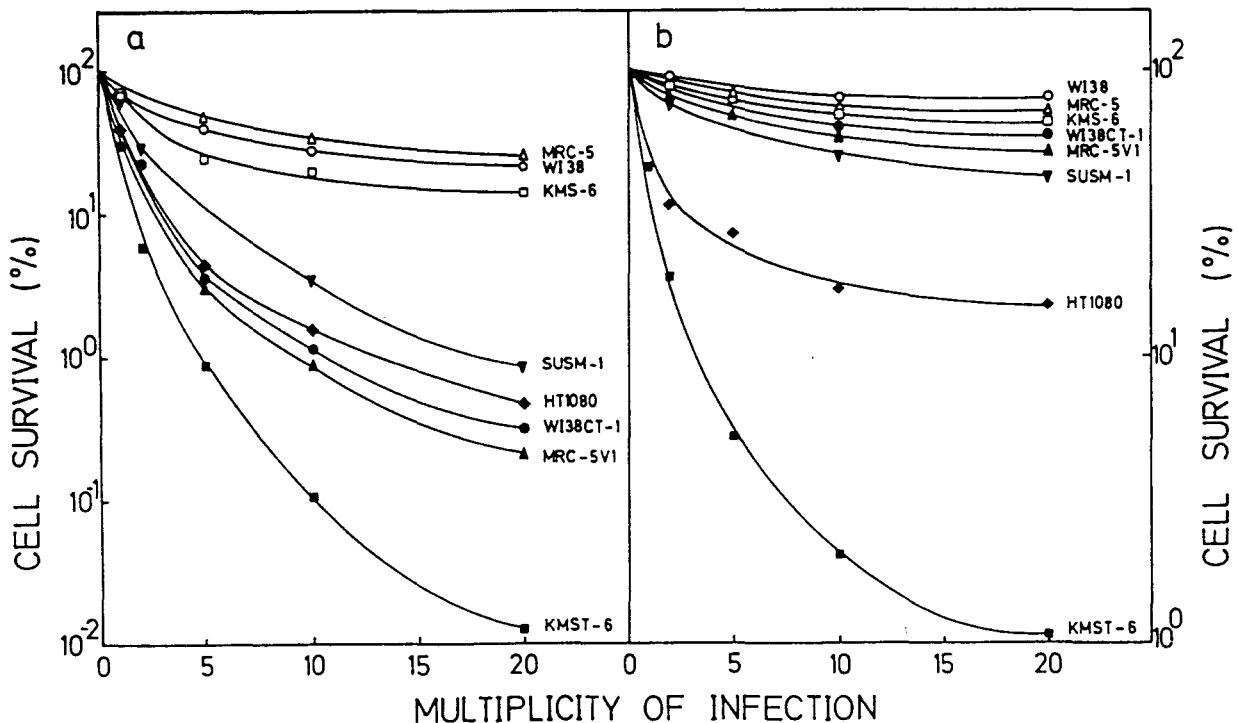


FIG. 1. Susceptibility of human fibroblasts to the killing effect of H-1 virus (panel a) or MVMP (panel b). Cells were infected at increasing multiplicities (PFU per cell), and their survival was determined by measuring their residual colony-forming ability. Open symbols, untransformed cells; closed symbols, in vitro transformed or tumor-derived cells.

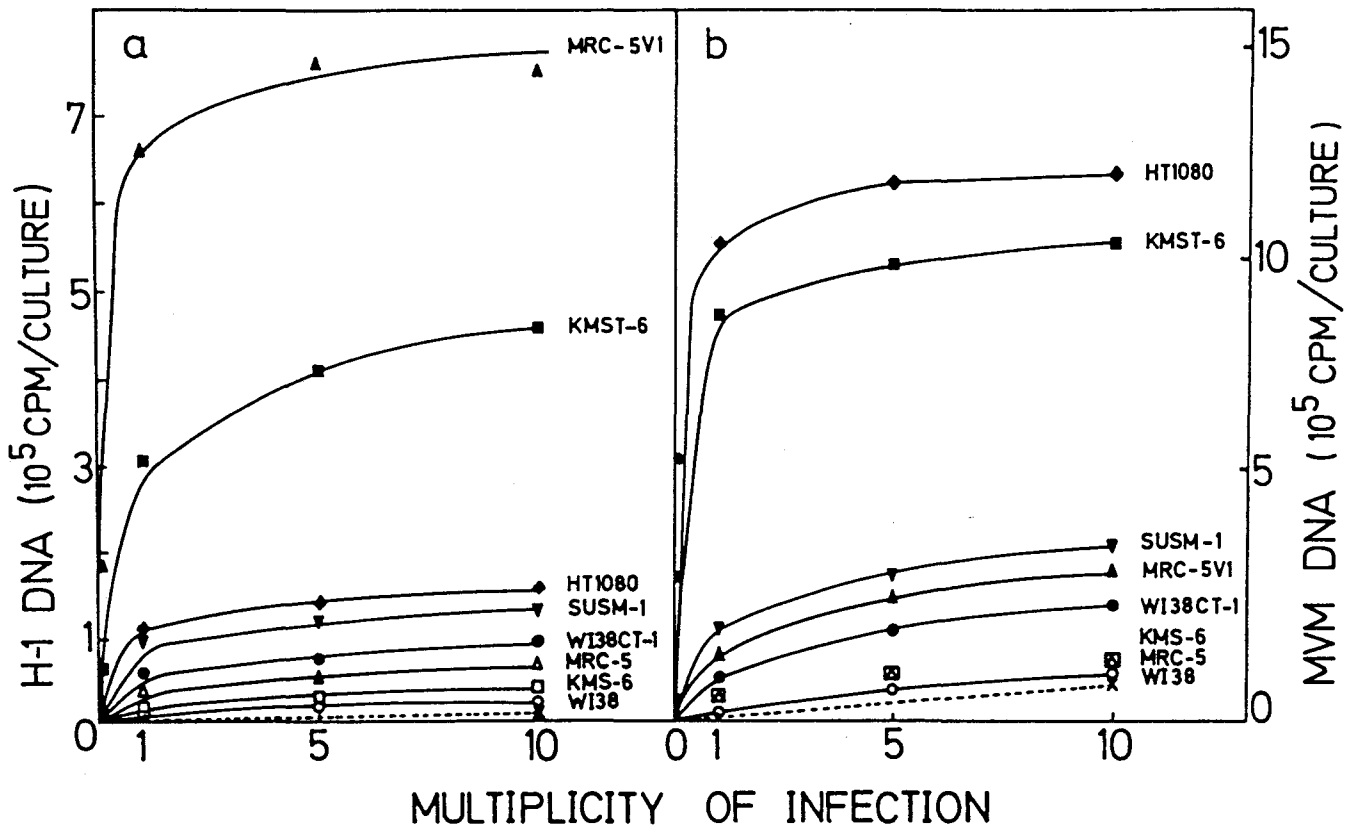


FIG. 2. Accumulation of H-1 virus (panel a) or MVMp (panel b) DNA by normal and transformed human fibroblasts. Cultures were infected at increasing multiplicities, and their viral DNA contents were determined by dispersed cell assays at 30 h p.i. The amount of input DNA, as measured 2 h p.i., was similar in all cells and is given for comparison (broken line).

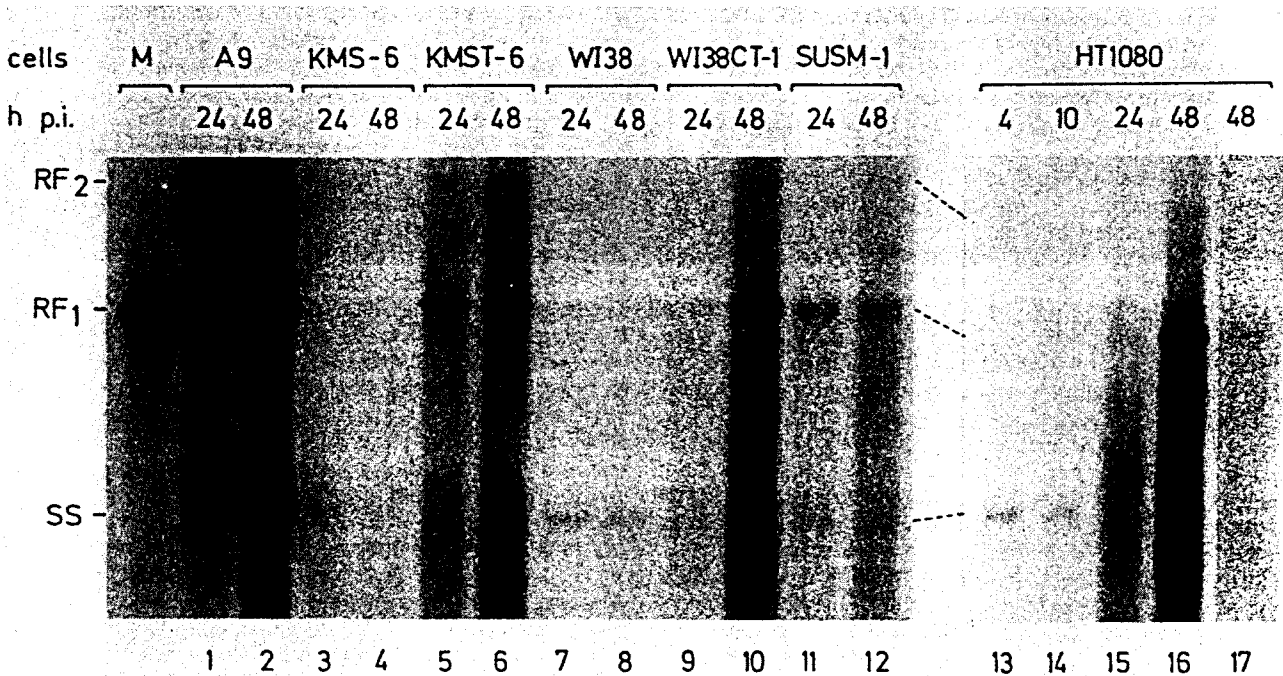


FIG. 3. Pattern of MVMp DNA present in normal and transformed human fibroblasts. Cells were infected with ³H-labeled MVMp (2×10^5 cpm per culture) at an MOI of 2 to 5 PFU per cell. Hirt extracts were prepared at intervals p.i., fractionated by gel electrophoresis, and blot hybridized against a ³²P-labeled probe. Samples were adjusted to the same amount of input DNA (3.6×10^3 cpm of [³H]DNA per lane) except for A9 cells (1.8×10^3 cpm of [³H]DNA). In vitro converted virion DNA was used as a marker (M). Lanes 16 and 17 represent the same blot, with a five-times-shorter exposure to film for the latter lane.

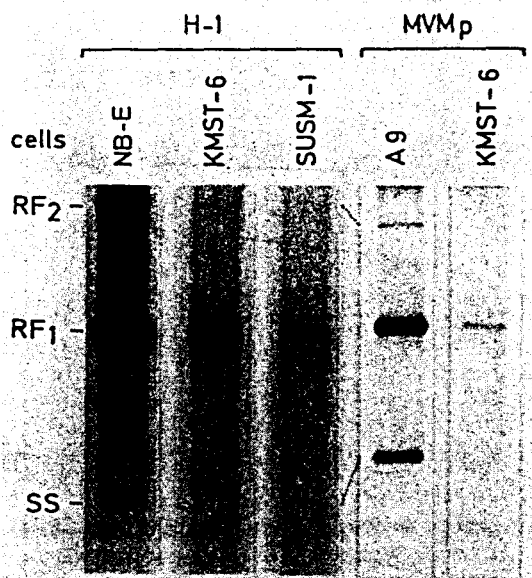


FIG. 4. MVMP DNA synthesis in sensitive human and rodent cells. A9, NB-E, KMST-6, and SUSM-1 cells were infected with H-1 virus or MVMP at an MOI of 5. $^{32}\text{P}_i$ (66 $\mu\text{Ci/ml}$) was added 10 h later, and Hirt extracts were prepared at 24 h p.i. Lanes were count matched with 8×10^5 cpm of ^{32}P -labeled DNA. The autoradiograms of dried gels are shown.

the latter two forms could be found in the transformed human lines KMST-6 and SUSM-1. Therefore, transformed human fibroblasts provide cases in which the production of monomeric and oligomeric RFs contributes to parvovirus DNA amplification without concomitant formation of SS viral DNA.

Production of infectious virus. To determine the ability of human fibroblasts to support the production of H-1 virus or MVMP, virus was inoculated to parallel cultures and titered at intervals after infection. Cell lines in which the virus titer increased with time were scored as producers. None of the normal lines achieved a detectable production of either H-1 virus (Table 1) or MVMP (Table 2). Indeed, parvovirus titers dropped gradually with time in these cultures for all MOIs used, as exemplified by Fig. 5 for MVMP-infected KMS-6 cells. On the other hand, all cultures of transformed human fibroblasts produced minute but significant amounts of MVMP (Table 2). Given its very small extent, such a production was masked by input virus unless cells were infected at a low multiplicity, as illustrated in Fig. 5 for KMST-6. The capacity of transformed cultures for producing H-1 virus was variable (Table 1). Only the SUSM-1 line released appreciable amounts of infectious H-1 virus, although its ability to amplify viral DNA was moderate. Low levels of H-1 virus were formed in WI38CT-1 and HT1080 cultures, whereas no H-1 virus production was detected in the KMST-6 line. The low efficiency of most transformants to sustain a productive H-1 virus infection despite a high level of viral DNA amplification (Table 1) may be related to their low capacity to accumulate progeny SS DNA, as mentioned above (Fig. 4). It is remarkable that among tested transformants, the most H-1 virus-sensitive line, KMST-6, was not producing virus, whereas the least sensitive one, SUSM-1, was the best producer (Fig. 1a; Table 1). This lack of a correlation between sensitivity and production indicates that the acquisition of full permissiveness to the parvovirus

is not a prerequisite for the sensitization of transformed human fibroblasts to its cytopathic effect.

DISCUSSION

Two main findings are reported in this paper. First, transformation of human fibroblasts correlates with an increase in their sensitivity to autonomous parvoviruses H-1 virus and MVMP, irrespective of whether transformation is induced in vitro by a tumor virus, radiation, or a chemical mutagen or whether it takes place spontaneously. This result suggests that the occurrence of step(s) of human cell transformation is associated with the expression of a parvovirus-hypersensitive phenotype. Second, the greater cytopathogenicity of parvoviruses for transformed versus normal cells parallels a higher level of viral DNA replication in the former cultures, although infection is not necessarily productive. One may conclude from the latter observation that the hypersensitivity of transformed human fibroblasts to H-1 virus and MVMP is likely to reflect an up modulation of their permissiveness to these viruses but does not require the viral life cycle to go to completion.

Low susceptibility of normal human fibroblasts to H-1 virus and MVMP. The data presented show that all three finite-life cultures of embryonic human fibroblasts tested are unable to sustain a productive H-1 virus or MVMP infection. This result confirms and extends previous observations by us and others, showing that normal human fibroblasts, whether of embryonic, neonatal, or adult origin, fail to produce infectious H-1 virus (4, 13, 35, 42). Untransformed fibroblasts undergo an abortive type of H-1 virus or MVMP infection, characterized by normal virus uptake but very limited intracellular viral DNA amplification. On no occasion could RF2

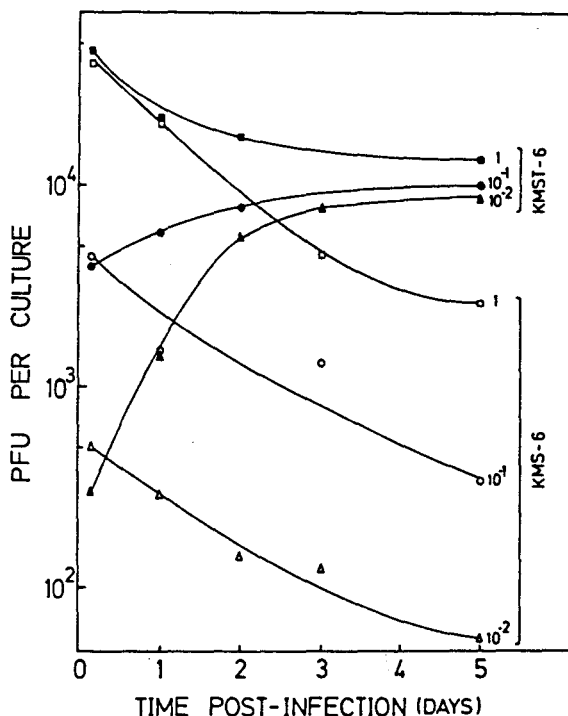


FIG. 5. Fate of infectious MVMP in normal and radiation-transformed human cells. Normal (KMS-6) and gamma-ray-transformed (KMST-6) fibroblasts were infected with MVMP at indicated multiplicities and further incubated. Virus titers were measured as a function of time p.i. Numbers by symbols represent MOI.

or progeny SS viral DNA be detected in Southern blots prepared from these cells. The biological outcome of the abortion of H-1 virus and MVMP replication in most normal cells is to limit viral cytopathogenicity to a mild effect which can be revealed by cloning efficiency tests but from which cultures recover rapidly as virus dilutes out.

Enhanced susceptibility of transformed human fibroblasts to H-1 virus and MVMP. Transformed cells produce higher amounts of MVMP and H-1 virus than their untransformed parent cells do. Viral DNA replication limitations present in normal cells and overcome in transformed derivatives are not known. Since virus uptake occurs with similar efficiencies in both types of cultures, the primary step of the viral life cycle which is stimulated in transformed cells appears to be intracellular. Transformation may conceivably correlate with the activation of a cellular permissiveness function(s) regulating or effecting parvovirus replication. Viral DNA amplification taking place in the transformants seems to proceed as in standard permissive hosts because RF1 and RF2 replicative intermediates accumulate to high levels and form covalent complexes with terminal proteins (2). However, a late step of the virus life cycle, i.e., the synthesis of SS progeny DNA and, consequently, the production of infectious virus, is inefficient or even undetectable in most of the transformants studied. This deficiency occurs despite the capacity of these cells for the assembly of empty capsids (Cornelis et al., unpublished observations). It has been suggested that assembled capsids are subject to modifications which render them able to drive the synthesis of progeny DNA and concomitant encapsidation (21). It is conceivable that such a maturation is defective in many transformants. Alternatively, cellular or viral factors involved in the processing of replicative forms, the generation of progeny viral DNA, or both may be present in limiting amounts in the majority of the transformants analyzed. Hence, transformed human fibroblasts often represent incomplete permissive systems insofar as they support the synthesis of viral DNA (this paper) as well as nonstructural and structural proteins (4, 25; Cornelis et al., unpublished data) while producing little infectious virus. Such nonproductive infections, accompanied by the accumulation of large amounts of viral DNA, are reminiscent of the restrictive interactions observed between TM3 mouse testicular cells and MVMP (10) or between A9 mouse fibroblasts and the lymphotropic strain of minute virus of mice (31, 32, 39). In the latter system, a block to the initiation of DNA transcription may be involved in the restriction (6).

Transformed human fibroblasts are much more sensitive to the lytic action of MVMP and H-1 virus than their normal parent cells are. The enhanced—although not necessarily full—permissiveness of human cell transformants to virus replication is likely to contribute to their killing, although the cytopathic step(s) of the parvoviral life cycle remains to be determined. A potential candidate consists of viral nonstructural proteins because these are suspected of being cytotoxic (28) and are expressed at a higher level by transformed cultures than by their normal progenitors (Cornelis et al., unpublished data).

Correlation between cell transformation and sensitivity to parvoviruses. The contribution of transformation to the sensitization of human fibroblasts to H-1 virus and MVMP remains to be elucidated. It was recently shown that the expression of different oncogenes of cellular (activated human *Ha-ras* 1) or viral (polyomavirus middle T and SV40 large T) origin in established murine fibroblast lines correlates with an increase in their susceptibility to MVMP (19).

Interestingly, a production of H-1 virus could also be induced in human embryonic lung cells by coinfecting them with adenovirus 12 (13). It is not known, however, whether the expression of adenovirus early-transforming genes is involved in the latter helper effect. Qualitatively or quantitatively activated oncogenes have been identified in two of the transformants studied here, namely *c-Ki-ras* 2 and *c-myc* in WI38CT-1 cells (18) and *N-ras* in the HT1080 line (15). It is a matter of speculation whether changes at the level of these oncogenes are connected with the enhanced susceptibility of corresponding cells to the parvoviruses.

Since transformation is a multistep process, another interesting question is whether the increase in cell permissiveness correlates with the expression of specific transformation traits. Immortalization does not seem to be a prerequisite for sensitization of human fibroblasts to rodent parvoviruses because the susceptibility of SV40 transformants is enhanced irrespective of whether they have a finite or infinite life span (4). Moreover, established lines of rodent cells can resist parvoviruses and be sensitized upon transformation (19, 20). No correlation was found between the growth rates of human and rodent fibroblasts and their sensitivity to H-1 virus or MVMP (this paper; 19). All transformants studied have aneuploid karyotypes, a characteristic that they share with many tumor cells and that is believed to be of importance for malignant progression (8). In addition, the transformants display alterations in both their morphology and their growth properties (12, 22–24). However, transformed human fibroblasts obtained by SV40 infection or physicochemical treatments clone poorly in soft agar and are not tumorigenic when inoculated in nude mice (22, 23). Similarly, the degree of susceptibility of established murine cell lines to MVMP does not parallel their anchorage-independent growth efficiency (19). Therefore, the potentiation of parvovirus replication and cytopathogenicity does not appear to correlate with cell transformation as a whole but rather with specific and possibly early event(s) of this multistage process, the nature of which remains to be determined. In this respect, autonomously replicating parvoviruses of rodents may prove useful for identification of human cells on the way to malignant transformation and to select for their normal homologs.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Commission of the European Communities and by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and Centre National de la Recherche Scientifique (France) and from the Ministère de la Politique Scientifique and Caisse Générale d'Épargne et de Retraite (Belgium). P.B. was supported by a grant from the Fondation Mérieux.

LITERATURE CITED

1. Anderson, M. J., and J. R. Pattison. 1984. The human parvovirus. *Arch. Virol.* 82:137–148.
2. Avalosse, B. L., Y. Q. Chen, J. J. Cornelis, N. Duponchel, P. Becquart, M. Namba, and J. Rommelaere. 1987. Amplification of parvoviral DNA as a function of host-cell transformation, p. 140–152. *In* J. R. Schlehofer and H. zur Hausen (ed.), *Role of DNA amplification in tumor initiation and promotion*. J. B. Lippincott Company, Philadelphia.
3. Bourguignon, G. J., P. J. Tattersall, and D. C. Ward. 1976. DNA of minute virus of mice: self-priming, nonpermuted, single-stranded genome with a 5'-terminal hairpin duplex. *J. Virol.* 20:290–306.
4. Chen, Y. Q., F. de Foresta, J. Hertoghs, B. L. Avalosse, J. J. Cornelis, and J. Rommelaere. 1986. Selective killing of simian virus 40-transformed fibroblasts by parvovirus H-1. *Cancer Res.*

- 46:3574-3579.
5. Cornelis, J. J., Z. Z. Su, D. C. Ward, and J. Rommelaere. 1981. Direct and indirect effects of ultraviolet light on the mutagenesis of parvovirus H-1 in human cells. *EMBO J.* 1:693-699.
 6. Cotmore, S. F., and P. Tattersall. 1987. The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv. Virus Res.* 33: 91-174.
 7. Cukor, G., N. R. Blacklow, D. Hoggan, and K. I. Berns. 1984. Biology of adenoassociated virus, p. 33-36. *In* K. I. Berns (ed.), *The parvoviruses*. Plenum Publishing Corp., New York.
 8. Duesberg, P. H. 1987. Cancer genes: rare recombinants instead of activated oncogens. A review. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:2117-2124.
 9. Faust, E. A., and G. Gloor. 1984. Characterization of a metastable, partially replicated dimeric intermediate of minute virus of mice. *J. Virol.* 49:621-625.
 10. Guetta, E., D. Ron, and J. Tal. 1986. Developmental-dependent replication of minute-virus-of-mice in differentiated mouse testicular cell lines. *J. Gen. Virol.* 67:2549-2554.
 11. Heilbronn, R., J. R. Schlehofer, and H. zur Hausen. 1984. Selective killing of carcinogen-treated SV40-transformed Chinese hamster cells by a defective parvovirus. *Virology* 136: 439-441.
 12. Huschtscha, L. I., and R. Holliday. 1983. Limited and unlimited growth of SV40-transformed cells from human diploid MRC-5 fibroblasts. *J. Cell Sci.* 63:77-99.
 13. Ledinko, N., S. Hopkins, and H. Toolan. 1969. Relationship between potentiation of H-1 growth by human adenovirus 12 and inhibition of the "helper" adenovirus by H-1. *J. Gen. Virol.* 5:19-31.
 14. Linser, P., H. Bruning, and R. W. Armentrout. 1979. Uptake of minute virus of mice into cultured rodent cells. *J. Virol.* 31: 537-545.
 15. Marshall, C. J., A. Hall, and R. A. Weiss. 1982. A transforming gene present in human sarcoma cell lines. *Nature (London)* 299: 171-173.
 16. McMaster, G. K., P. Beard, H. D. Engers, and B. Hirt. 1981. Characterization of an immunosuppressive parvovirus related to the minute virus of mice. *J. Virol.* 38:317-326.
 17. Merchlinsky, M. J., P. J. Tattersall, J. J. Leary, S. F. Cotmore, E. M. Gardiner, and D. C. Ward. 1983. Construction of an infectious molecular clone of the autonomous parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.* 47:227-232.
 18. Mizuki, K., K. Nose, H. Okamoto, N. Tsuchida, and K. Hayashi. 1985. Amplification of c-Ki-ras gene and aberrant expression of c-myc in WI-38 cells transformed *in vitro* by gamma-irradiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128:1037-1043.
 19. Mousset, S., J. J. Cornelis, N. Spruyt, and J. Rommelaere. 1986. Transformation of established murine fibroblasts with an activated cellular Harvey ras oncogene or the polyoma virus middle T gene increases cell permissiveness to parvovirus minute virus of mice. *Biochimie* 68:951-955.
 20. Mousset, S., and J. Rommelaere. 1982. Minute virus of mice inhibits cell transformation by simian virus 40. *Nature (London)* 300:537-539.
 - 20a. Mousset, S., and J. Rommelaere. 1988. Susceptibility to parvovirus minute virus of mice as a function of the degree of host cell transformation: little effect of simian virus 40 infection and phorbol ester treatment. *Virus Res.* 9:107-117.
 21. Mueller, D. E., and G. Siegl. 1983. Maturation of parvovirus LuIII in a subcellular system. I. Optimal conditions for *in vitro* synthesis and encapsidation of viral DNA. *J. Gen. Virol.* 64: 1043-1054.
 22. Namba, M., K. Nishitani, F. Fukushima, T. Kimoto, J. Utsunomiya, and L. Hayflick. 1981. Neoplastic transformation of human diploid fibroblasts treated with chemical carcinogens and ⁶⁰Co gamma-rays. *Gann Monogr. Cancer Res.* 27:221-229.
 23. Namba, M., K. Nishitani, F. Hyodoh, F. Fukushima, and T. Kimoto. 1985. Neoplastic transformation of human diploid fibroblasts (KMST-6) by treatment with ⁶⁰Co gamma-rays. *Int. J. Cancer* 35:275-280.
 24. Namba, M., K. Nishitani, and T. Kimoto. 1980. Characteristics of WI38 cells (WI38CT-1) transformed by treatment with Co-60 gamma rays. *Gann* 71:300-307.
 25. Paradiso, P. R. 1984. Identification of multiple forms of the noncapsid parvovirus protein NCVPI in H-1 parvovirus-infected cells. *J. Virol.* 52:82-87.
 26. Paradiso, P. R., K. R. Williams, and R. L. Costantino. 1984. Mapping of the amino terminus of the H-1 parvovirus major capsid protein. *J. Virol.* 52:77-81.
 27. Rhode, S. L. 1978. H-1 DNA synthesis, p. 279-296. *In* D. C. Ward and P. Tattersall (ed.), *Replication of mammalian parvoviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
 28. Rhode, S. L., III. 1987. Construction of a genetic switch for inducible transactivation of gene expression in eucaryotic cells. *J. Virol.* 61:1448-1456.
 29. Rigby, P. W. J., M. Dieckmann, C. Rhodes, and P. Berg. 1977. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113:237-251.
 30. Rommelaere, J., and D. C. Ward. 1982. Effect of UV-irradiation on DNA replication of the parvovirus minute-virus-of-mice in mouse fibroblasts. *Nucleic Acids Res.* 10:2577-2596.
 31. Ron, D., and J. Tal. 1986. Spontaneous curing of a minute virus of mice carrier state by selection of cells with an intracellular block of viral replication. *J. Virol.* 58:26-30.
 32. Ron, D., P. Tattersall, and J. Tal. 1984. Formation of a host range mutant of the lymphotropic strain of minute virus of mice during persistent infection in mouse L cells. *J. Virol.* 52:63-69.
 33. Schutzbank, T., R. Robinson, M. Oren, and A. J. Levine. 1982. SV40 large tumor antigen can regulate some cellular transcripts in a positive fashion. *Cell* 30:481-490.
 34. Siegl, G. 1976. The parvoviruses. *Viol. Monogr.* 15:1-109.
 35. Singer, I. I., and S. L. Rhode. 1978. Electron microscopy and cytochemistry of H-1 parvovirus intracellular morphogenesis, p. 479-504. *In* D. C. Ward and P. Tattersall (ed.), *Replication of mammalian parvoviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
 36. Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.
 37. Spalholz, B. A., and P. Tattersall. 1983. Interaction of minute virus of mice with differentiated cells: strain-dependent target cell specificity is mediated by intracellular factors. *J. Virol.* 46: 937-943.
 38. Tattersall, P. 1978. Susceptibility to minute virus of mice as a function of host cell differentiation, p. 131-149. *In* D. C. Ward and P. Tattersall (ed.), *Replication of mammalian parvoviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
 39. Tattersall, P., and J. Bratton. 1983. Reciprocal production and restrictive virus-cell interactions of immunosuppressive and prototype strains of minute virus of mice. *J. Virol.* 46:944-955.
 40. Tattersall, P., P. J. Cawte, A. J. Shatkin, and D. C. Ward. 1976. Three structural polypeptides coded for by minute virus of mice, a parvovirus. *J. Virol.* 20:273-289.
 41. Tattersall, P., and D. C. Ward. 1978. The parvoviruses: an introduction, p. 3-12. *In* D. C. Ward and P. Tattersall (ed.), *Replication of mammalian parvoviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
 42. Toolan, H., and N. Ledinko. 1965. Growth and cytopathogenicity of H-viruses in human and simian cell cultures. *Nature (London)* 208:812-813.
 43. Walter, S., R. Richards, and R. W. Armentrout. 1980. Cell cycle-dependent replication of the DNA of minute virus of mice, a parvovirus. *Biochim. Biophys. Acta* 607:420-431.
 44. Winocour, E., and I. Keshet. 1980. Indiscriminate recombination in simian virus 40-infected monkey cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4861-4865.
 45. Jakobson, B., T. Koch, and E. Winocour. 1987. Replication of adeno-associated virus in synchronized cells without the addition of a helper virus. *J. Virol.* 61:972-981.

**EXPRESSION OF THE NON-STRUCTURAL PROTEINS OF
PARVOVIRUS MVMP FROM RECOMBINANT RETROVIRUSES:
PREDOMINANT ROLE OF THE PARVOVIRAL NS-1 PRODUCT IN
HOST CELL DISTURBANCE.**

PAUL BECQUART, JEAN-MARC VANACKER, NADINE DUPONCHEL,
AGNES BEGUE and JEAN ROMMELAERE.

Research in Virology. **Soumis.**

EXPRESSION OF THE NON-STRUCTURAL PROTEINS OF PARVOVIRUS
MVMP FROM RECOMBINANT RETROVIRUSES: PREDOMINANT ROLE OF
THE PARVOVIRAL NS-1 PRODUCT IN HOST CELL DISTURBANCE.

Paul Becquart^a, Jean-Marc Vanacker^{a,b}, Nadine Duponchel^a, Agnès Bègue^a
and Jean Rommelaere^{a,b*}.

^a Institut Pasteur de Lille, Molecular Oncology Unit, 59019 Lille Cedex, France;

^b Deutsches Krebsforschungszentrum, Applied Tumor Virology Program,
D-69009 Heidelberg, Germany.

Keywords : parvoviruses; recombinant retroviruses; cytotoxicity

Running title : cytotoxicity of MVMP non-structural proteins

*Corresponding author : Deutsches Krebsforschungszentrum, Angewandte
Tumorstudiologie, Abteilung 0610, Im Neuenheimer Feld 242, P. 101949,
D-69009 Heidelberg, Germany.

Summary

Stable Psi 2 cell transformants were selected for their resistance to neomycin after transfection with a retroviral pZipNeo-SVX vector carrying sequences encoding for the non-structural proteins of parvovirus Minute Virus of Mice (prototype strain, MVMp). Cells producing both NS-1 and NS-2 proteins (PsiNS) or only the NS-2 polypeptide (PsiNS2) were obtained. PsiNS cells exhibited morphological abnormalities and had a reduced clone-forming ability, whereas PsiNS2 cells were indistinguishable from the parental line. These cellular systems produced recombinant retroviral particles which transduced the NS gene(s) into mouse A9 cells. As in the case of Psi 2 cells, A9 transformants expressing both NS1 and NS2 proteins were impaired in their cloning efficiency. These results provided a direct confirmation of the predominant role of protein NS-1 in the cytopathic effect of parvoviruses.

MVMp belongs to the Parvoviridae, a family of non-enveloped viruses infecting a variety of animals (Pereira, 1989; Berns, 1991). The MVMp genome is a single-stranded DNA molecule that is composed of 5 149 nucleotides and is organized in two overlapping transcription units controlled by promoter P4 and P38, respectively (Cotmore and Tattersall, 1987). The early P4 promoter directs the production of alternatively spliced mRNAs, translated into the non-structural proteins NS-1 and NS-2 (Clemens and Pintel, 1988). The late P38 promoter is trans-activated by the NS-1 polypeptide (Doerig et al., 1988, 1990) and controls the production of the capsid proteins-encoding mRNAs (Labienc-Pintel and Pintel, 1986). The low genetic complexity displayed by parvoviruses is likely to contribute to their high dependence on host cell functions, some of which appearing to be restricted to proliferating cells (S-phase factors) in appropriate differentiation states (Berns 1991). It is worth noting that these lytic viruses can suppress spontaneously occurring and induced oncogenesis *in vivo* (Rommelaere and Tattersall, 1989). This property may be set in parallel with the fact that malignant transformation often correlates with an increase in cell

susceptibility to virus replication and killing effect (Rommelaere and Cornelis, 1991).

The non-structural proteins NS-1 (Cotmore et al., 1992, 1993) and NS-2 (Naeger et al., 1993) play a major role in viral DNA replication and genome expression. The cytotoxic effect of MVMp has been ascribed to NS-1 in possible synergy with NS-2 (Brandenburger et al., 1990). Nevertheless, published evidences of NS cytopathogenic effect were either indirect (Li and Rhode, 1990; Ozawa et al., 1988; Brandenburger et al., 1990) or required the preselection of cells harbouring inducible NS protein-encoding molecular clones (Caillet-Fauquet et al., 1990). The present study was therefore designed to confirm the cytotoxic activity of the NS proteins in a more direct way, i.e. through cell infection with recombinant retrovirus vectors harbouring NS genes. Moreover, this system allows to study the mechanism of the cell perturbation caused by the NS proteins in the absence of other parameters, such as viral DNA amplification and capsid formation.

Parvoviral sequences were recovered from the plasmid pMM984 which contains the whole infectious genome of MVMp inserted at the BamH I site of pBr322 (Merchinsky et al., 1983). The entire NS-1/NS-2 transcription unit (2.6 kb BssH II fragment of pMM984), including the complete P4 promoter, was cloned in the HinC II site of phage M13mp7, to generate BamH I extremities. The resulting BamH I digestion product was then inserted in the unique BamH I cloning site of the retroviral vector pZipNeo-SVX (Fig. 1), a pBR322 derivative harbouring a Moloney Murine Leukemia Virus (M-MuLV) deletion mutant which contains a neomycine resistance gene cloned downstream from the truncated gag sequence (Mann et al., 1983). This construct, designated to as pZipNeoNS, contains the original parvoviral splicing sites and is expected to produce the NS-1 protein and the various NS-2 isoforms. Plasmid pZipNeoNS2 (Fig 1) was obtained by deletion of the Spe I - BstE II (nt 915 to 1884) fragment located in the major intron of the NS transcription unit. This deletion introduces a frameshift in the coding sequence of NS-1, thus generating of a stop codon at nt 1916 and leading to the production of a truncated protein which could not

be recognized by the anti NS-1 serum used. The pZipNeoNS2 construct is assumed to produce the three isoforms of NS-2 (Morgan and Ward, 1986; Cotmore and Tattersall, 1990).

The pZipneoNS vector was further tested at the functional level by verifying that the NS-1 protein encoded by this construct was able to trans-activate the late parvoviral promoter P38, as it is the case for the original viral product (Rhode and Richard, 1987; Gu et Rhode, 1992). To this end, plasmid pULB3562, which contains the CAT reporter gene under the control of promoter P38 (Cornelis et al., 1988b), was transfected in human NB-E cells together with pZipNeoNS. As shown in Fig. 2, the NS-1 product expressed from the recombinant retroviral vector was as efficient as that encoded by the infectious MVMp molecular clone with respect to its ability to trans-activate the P38 promoter. Identical results were obtained whether the parvoviral sequence was inserted in the same or opposite orientation to the neomycin resistance gene, suggesting that NS gene transcription was mostly driven by the parvoviral P4 promoter. It should also be stated that the pZipneoNS2 vector had no detectable trans-activating effect, in agreement with its lack of a functional NS-1 gene and the requirement of the NS-1 protein for P38 trans-activation (Doerig et al., 1988).

To rescue recombinant retroviral particles, we used the packaging Psi 2 cells (NIH 3T3 transformants containing an endogenous provirus deriving from the M-MuLV that is defective for its own encapsidation) (Mann et al., 1983; Cepko et al., 1984)). Psi 2 cells were stably transformed with the above-mentioned pZipNeoNS/NS2 recombinant vectors, according to the Ca-phosphate precipitation method previously described (Graham et al., 1973). Neo-resistant cells were isolated in the presence of geneticine (G418, GIBCO) at a final concentration of 400 µg/ml. The capacity of these cells to produce parvoviral proteins was determined by immunoblotting and immunoprecipitation. To this end, we used monospecific antisera directed against NS-1 or NS-2 specific epitopes encoded by DNA sequence located in the large intron or in the C-terminal region of the NS transcription unit, respectively. As illustrated in Fig. 3B and 3C and summarized in Table 1, the NS-2 protein was

detected in pZipneoNS2-transformed cells (designated to as PsiNS2), while NS-1 and NS-2 polypeptides were visualized in the pZipneoNS transformants PsiNS. These cells were analysed for their cloning ability, in comparison with the PsiSVX line transformed by the empty retroviral vector. To this aim, appropriate number of cells were seeded onto Petri dishes. Three weeks later, surviving cell clones were stained and counted as previously described (Cornelis et al., 1988a). As indicated in Table 1, the clonogenicity of PsiNS cells was significantly reduced compared to that of control PsiSVX cells (30 versus $68 \pm 10\%$). This disturbance of host cells by NS proteins was accompanied by other signs of cytopathogenicity such as cytoplasmic inclusions, high refringence and cytoplasmic retraction (data not shown). In contrast, the clonogenicity of the PsiNS2 cells ($62 \pm 21\%$) was not significantly impaired by the production of NS-2. The lack of a major cytopathic effect of NS-2 alone was further supported by the absence of the above-mentioned signs of cellular stress in PsiNS2 cultures that exhibited a strong attachment to the Petre dishes (data not shown).

To assess the shuttle ability of the retroviral vectors, the culture medium conditioned for one day by transformed PsiNS cells, was harvested and inoculated to A9 cell monolayers for 2 h at 37°C, in the presence of 0.4 µg/ml of polybrene. Culture medium was supplemented with G418 24 h post-infection. Neo-resistant A9 cells were then isolated and amplified. As shown in Fig. 3A and Table 1, the presence of the NS-1 protein was revealed by immunoblotting in A9 cells transformed by the vector pZipNeoNS and designated to A9NS. This result demonstrates the transducing capacity of the retroviral vector for the NS-1 protein expression. Moreover, the cytotoxicity of NS proteins was even more obvious in A9 cells infected with recombinant retroviruses harbouring the NS genes. Indeed, the neo-resistant A9 clones emerging after infection with the retroviral particles produced by PsiNS cells, proved to be difficult to amplify. Most of these clones died early during their development. Moreover, the few surviving clones had a reduced plating efficiency, compared with A9 cells infected by the empty vector pZipNeoSVX (26 versus $50 \pm 3\%$). By analogy with the Psi2 system, the reluctance of MVMp-permissive A9 cells to grow after

infection with NS-transducing retroviral particles may be ascribed to the cytopathogenic effect of the NS-1 product.

Using the retroviral vector pZipNeo-SVX, we have established stably transfected or infected cell populations expressing either NS-2 or both NS-1 and NS-2 parvoviral proteins. Our data show in a direct way that the non-structural proteins of MVMP have an intrinsic cytopathic potential, as previously suggested by other studies (Brandenburger et al., 1990; Caillet-Fauquet et al., 1990). Moreover, the present results indicate that the NS-2 protein alone causes little cell disturbance, supporting the contention that the NS-1 protein is the main effector of parvoviral cytotoxicity in the cellular system studied. Surviving clones expressing the non-structural proteins of MVMP at a subtoxic level, represent a valuable living material to further study NS-1 and NS-2 functions in the absence of parvoviral DNA amplification.

Acknowledgements

P.B. and J.-M.V. were supported by grants of the Fondation Mérieux and the Ministère de l'Industrie et de la Recherche, respectively. This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique, Association pour la recherche contre le Cancer, and Institut Pasteur de Lille (France).

References

- Berns, K.I. (1990) Parvovirus replication. *Microbiol. Rev.* **54**, 316-329.
- Berns, K.I. (1991) Parvoviridae and their replication. *Fundamental virology*, second edition, (Ed.) B.N. Fields, D.M. Knipe et coll. . Raven Press, Ltd., New York. Ch. 32, 817-837.
- Brandenburger, A., Legendre, D., Avalosse, B. & Rommelaere, J. (1990) NS-1 and NS-2 proteins may act synergistically in the cytopathogenicity of parvovirus MVMp. *Virology* **174**, 576-584.
- Caillet-Fauquet, P., Perros, M., Brandenburger, A., Spegelaere, P. & Rommelaere, J. (1990) Programmed killing of human cells by means of an inducible clone of parvoviral genes encoding non-structural proteins. *EMBO J.* **9**, 2989-2995.
- Cepko, C.L., Roberts, B.E. & Mulligan, R.C. (1984) Construction and applications of a highly transmissible murine retrovirus shuttle vector. *Cell* **37**, 1053-1062.
- Clemens, K.E. & Pintel, D.J. (1988) The two transcription units of the autonomous parvovirus minute virus of mice are transcribed in a temporal order. *J. Virol.* **62**, 1448-1451.
- Cornelis, J.J., Becquart, P., Duponchel, N., Salomé, N., Avalosse, B., Namba, M. & Rommelaere, J. (1988a) Transformation of human fibroblasts by ionising radiation, a chemical carcinogen, or simian virus 40 correlates with an increase in susceptibility to the autonomous parvoviruses H-1 and minute virus of mice. *J. Virol.* **62**, 1679-1686.
- Cornelis, J.J., Spruyt, N., Spegelaere, P., Guetta, E., Darawshit, T., Cotmore, S.F., Tal J. & Rommelaere, J. (1988b) Sensitization of transformed rat fibroblasts to killing by parvovirus minute virus of mice correlates with an increase in viral gene expression. *J. Virol.* **62**, 3438-3444.
- Cotmore, S.F., Nesch, J.P.F. & Tattersall, P. (1992) In vitro excision and replication of 5' telomeres of minute virus of mice DNA from cloned palindromic concatemer junctions. *Virology* **190**, 365-377.

- Cotmore, S.F., Nüesch, J.P.F. & Tattersall, P. (1993) Asymmetric resolution of a parvovirus palindrome in vitro. *J. Virol.* **67**, 1579-1589.
- Cotmore, S.F. & Tattersall, P. (1987) The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv. Virus Res.* **33**, 91-174.
- Cotmore, S.F. & Tattersall, P. (1990) Alternate splicing in a parvoviral non-structural gene links in a common amino-terminal sequence to downstream domains which confer radically different localization and turnover characteristics. *Virology* **177**, 477-487.
- Doerig, C., Bernhard, H., Antonietti, J.P. & Beard, P. (1990) Non-structural proteins of parvoviruses B19 and minute virus of mice controls transcription. *J. Virol.* **64**, 387-396.
- Doerig, C., Hirt, B., Beard, P. & Antonietti, J.P. (1988) Minute virus of mice non-structural protein NS-1 is necessary and sufficient for trans-activation of the viral P39 promoter. *J. Gen. Virol.* **69**, 2563-2573.
- Gorman, C.M., Moffat, L.F. & Howard, B.H. (1982) Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyl-transferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **2**, 1044-1051.
- Graham, F.L. & van der Erb, A.J. (1973) Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology* **52**, 456-457.
- Labienc-Pintel, L. & Pintel, D. (1986). The minute virus of mice P39 transcription unit can encode both capsid proteins. *J. Virol* **57**, 1163-1167.
- Li, X. & Rhode III, S.L. (1990) Mutation of lysine 405 to serine in the parvovirus H-1 NS1 abolishes its functions for viral DNA replication, late promoter trans-activation, and cytotoxicity. *J. Virol.* **64**, 4654-4660.
- Mann, R., Mulligan, R.C. & Baltimore, D.B. (1983) Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell* **33**, 153-159.

- Merchinsky, M.J., Tattersall, P., Leary, J.J., Cotmore, S.F., Gardiner, E.M. & Ward, D.C. (1983) Construction of an infectious molecular clone of the autonomous parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.* **47**, 227-232.
- Miller, A.D. & Rosman, G.J. (1989) Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *Biotechniques* **7**, 980-985.
- Naeger, L.K., Salomé, N. & Pintel, D.J. (1993) NS2 is required for efficient translation of viral mRNA in minute virus of mice-infected murine cells. *J. Virol.* **67**, 1034-1043.
- Ozawa, K., Ayub, J., Kajigaya, S., Shimada, T. & Young, N. (1988) The gene encoding the nonstructural protein of B19 (human) parvovirus may be lethal in transfected cells. *J. Virol.* **62**, 2884-2889.
- Pereira, M.S. (1989) Parvoviridae. *in* "Andr we's viruses of vertebrates (5th Ed.)" (J.S. Porterfield), (pp. 371-394), Bailliere Tindal, London.
- Rommelaere, J. & Cornelis, J.J. (1991), Antineoplastic activity of Parvoviruses. *J. Virol. Methods* **33**, 233-251
- Rommelaere, J. & Tattersall, P. (1989) Oncosuppression by parvoviruses. *in* "Handbook of Parvoviruses" (vol. 2) (P. Tijssen) (pp. 41-57), CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.

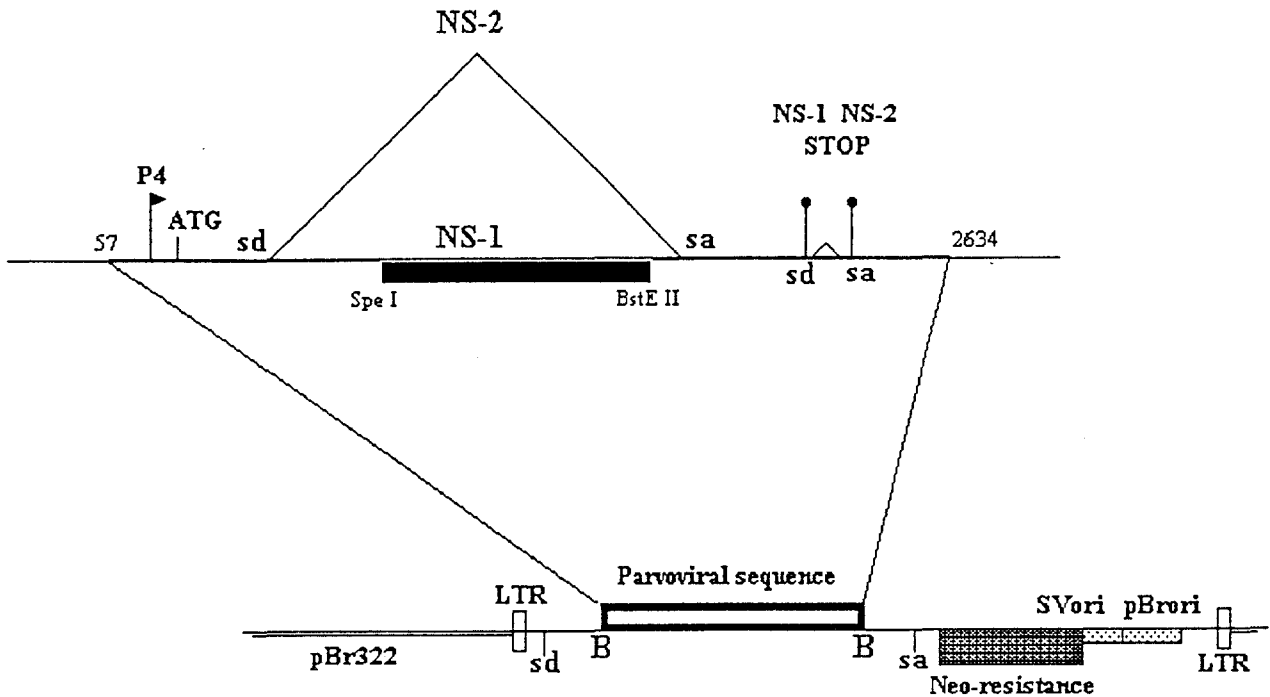


Fig. 1. Cloning of parvoviral NS sequences in a retroviral vector. The NS-1/NS-2 gene (BstE II fragment of MVMP DNA, extending from nt 57 to nt 2634) (upper panel) was inserted in the BamH I (B) cloning site of the expression vector pZipNeo-SVX, generating pZipNeo-NS (lower panel). Prior deletion of the Spe I - BstE II fragment (nt 915 to nt 1884) from the large intron gave rise to the recombinant pZipNeo-NS2. For the sake of simplicity, variations in the splicing of the small parvoviral intron are not indicated.

sd: splice donor site. sa: splice acceptor site. SVori and pBrori: replication origins of SV40 and pBr322, respectively. LTR: long terminal repeat. flag: start of the promoter P4-directed transcription unit NS.

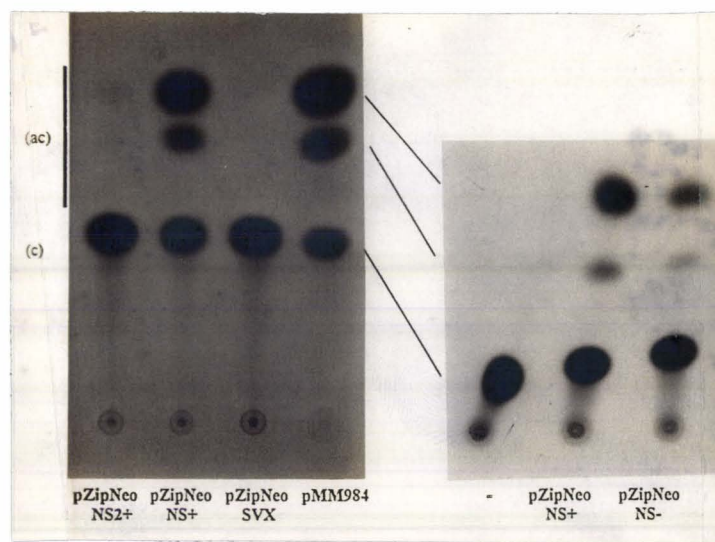


Fig. 2. Trans-activation of the late parvoviral promoter P38 by the NS-1 protein. Human NB-E cells were cotransfected with 1 μ g each of the reporter plasmid pULB3562 (p38CAT) and either of the plasmids indicated below. pMM984, an infectious molecular clone of MVMp, was used as a positive control. The pZipneoNS(2) vectors contained NS(2) and Neo genes in the same (+) or opposite (-) orientations. CAT activities were determined 48 h after transfection by incubation of extracts from NB-E cells with 0.1 μ Ci of 14 C Chloramphenicol for 2 h at 37°C (Gorman et al., 1982). Positions of non-acetylated (c) and acetylated (ac) chloramphenicol are shown.

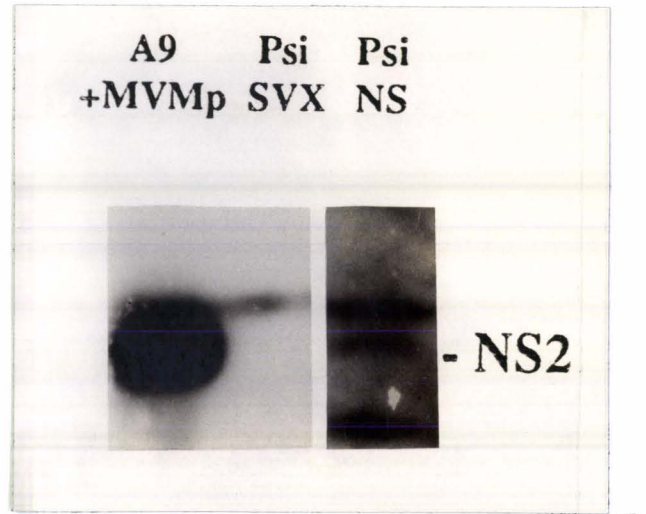
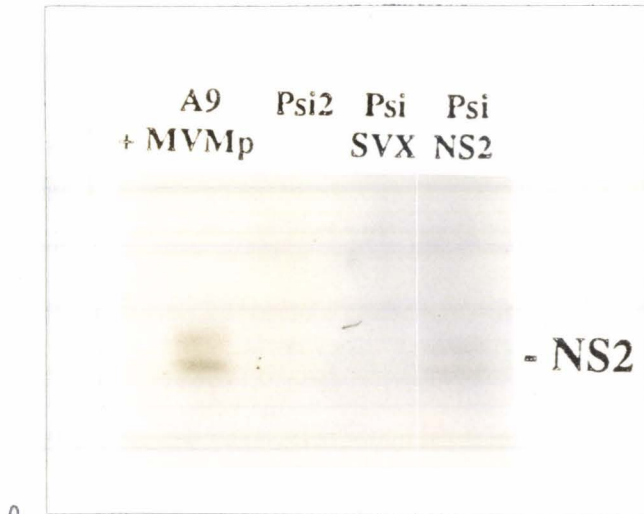
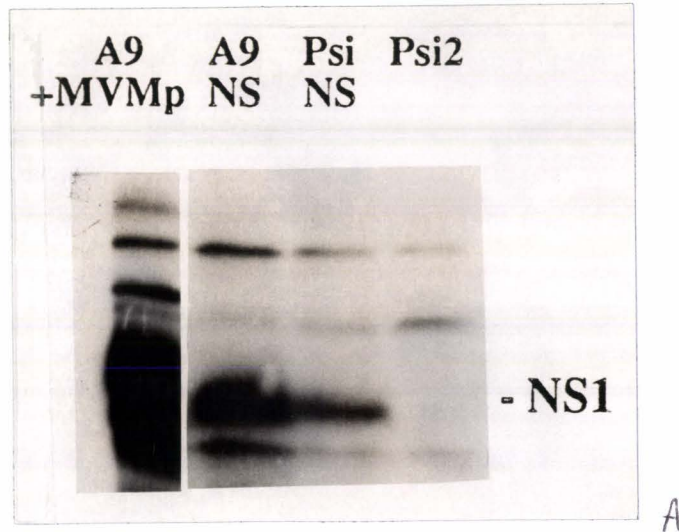


Fig. 3. Expression of the parvoviral proteins NS-1 and NS-2 in cells transfected or infected by recombinant retroviral vectors. Cultures (10^6 cells) were incubated for 1 h in methionine-free medium supplemented with 200 μ Ci of 35 S-L-methionine (88 Ci/mmol; Amersham.). Radiolabeled polypeptides were immunoprecipitated from cell extracts with specific antibodies directed against NS-2. Equal cell equivalents of total 35 S-labeled proteins ($5 \cdot 10^6$ cpm) were used for all immunoprecipitations and loaded on a SDS-polyacrylamide gel. The autoradiogram of dried gel is shown (panel B).

Total proteins extracted from 10^6 unlabeled cells were analysed by immunoblotting after SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (panel A and C). Parvoviral NS proteins were detected by mono specific antisera and revealed with 125 I-labeled protein A (0.1 μ Ci per 100 cm^2 of membrane; Amersham). MVMp-infected A9 cells were processed 24 h after virus inoculation and used as a positive control. The PsiNS lane in panel C (from the same blot) was exposed five-times-longer. NS1 and NS2 positions are shown.

Table 1 : Characterization of cells transduced with recombinant retroviral vectors harbouring NS-1 and/or NS-2 genes.

<u>Cells^a</u>	<u>NS protein production^b</u>		<u>Clonogenicity (%)^c</u>
	<u>NS-1</u>	<u>NS-2</u>	
PsiSVX	-	-	68
PsiNS	+	+	30
PsiNS2	-	+	62
A9SVX	-	-	47
A9NS	+	n.d.	26

^a Stable transformants transfected with pZipNeoSVX (PsiSVX) or infected with PsiSVX-produced retroviruses (A9SVX) were used as negative controls. Cells transformed with the equivalent constructs harbouring both NS-1 and NS-2 genes or NS-2 alone were designated to as PsiNS (A9NS) and PsiNS2, respectively.

^b The presence of NS-1 and NS-2 protein was revealed (+) or not (-) by western blotting and immunoprecipitation, using monospecific antisera.

^c The cloning efficiency was calculated as the ratio of the number of clones to that of seeded cells, as measured 15 days after subculturing.

n.d. : not determined

Résumé

Des cellules Psi 2 ont été sélectionnées pour leur résistance à la néomycine, après avoir été transfectées par un vecteur rétroviral pZipneo-SVX transportant des séquences codant pour les protéines non-structurales (NS) du parvovirus MVM (souche prototype, MVMp). Des cellules produisant conjointement NS-1 et NS-2 (PsiNS) ou seulement NS-2 (PsiNS2) ont ainsi été obtenues. Alors que les cellules PsiNS manifestent des anomalies morphologiques et une aptitude réduite à former des colonies, les cellules PsiNS2 sont indistinguables de leur lignée parentale sous ce rapport. Les cellules PsiNS produisent des particules rétrovirales qui sont capables de transduire les séquences parvovirales dans les cellules de souris A9. Comme dans le cas du système Psi, la production de la protéine NS-1 perturbe fortement la croissance des cellules A9 transformées par les rétrovirus recombinants. Ces résultats confirment le rôle prédominant de la protéine NS-1 dans l'effet cytopathique exercé par les parvovirus.

